

Virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRSV) en granjas porcinas tecnificadas del Estado de México

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in technified pig farms from the State of México

Sandra Maricruz López Heydeck^a, Gabriel Gerardo Huitrón Bravo^a, Salvador Lagunas Bernabé^b, Edgardo Soriano Vargas^b, Arturo Cabrera Torres^c, Fernando de la Cruz Valdés^c

RESUMEN

Se realizó un estudio transversal por conglomerados en una etapa, de abril a septiembre de 2011, en cerdos de más de 11 semanas de edad, de 11 granjas, para analizar la situación de PRRSV en granjas tecnificadas del Estado de México. Se colectaron muestras de suero (n=220) para ELISA y sangre (n=80) para transcripción en reversa y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real en un solo paso (RTqPCR) para PRRSV, e hisopos nasales (n= 425) para el aislamiento de posibles bacterias patógenas de la enfermedad del complejo respiratorio porcino (CRP). También se aplicó un cuestionario. ELISA mostró una seroprevalencia verdadera de 30.67 %, siendo mayor la probabilidad de ser seropositivos en granjas con antecedentes y calendario de vacunación y de ubicación urbana-semiurbana; los cerdos fueron seroreactivos en 7/11 granjas (63.63 %). RTqPCR mostró viremia en 2/80 (2.5 %) cerdos analizados, de 2/11 granjas (18.18 %); una cerda infectada con PRRSV norteamericano que mostró signos clínicos de la enfermedad y una cerda infectada con PRRSV europeo que no mostró ningún signo clínico evidente de infección. Dos granjas no mostraron cerdos seropositivos o virémicos, no tienen antecedentes ni calendario de vacunación y están ubicadas en una zona semirural. En todas las granjas se aisló *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus suis*; en algunas granjas y con menos frecuencia *Actinobacillus* spp (4/11) y *Pasteurella* spp (3/11). Es el primer reporte en México de infección por PRRSV europeo.

PALABRAS CLAVE: PRRSV, PCR, ELISA, Enfermedad del complejo respiratorio del cerdo.

ABSTRACT

A cluster cross sectional study in a single stage was carried out from April to September 2011 on pigs over 11 wk old from 11 farms, to analyze the viral porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRSV) status of technified farms of the State of Mexico. Sera samples (n=220) for ELISA, blood samples (n=80) for one step real-time quantitative reverse transcriptase-PCR (RTqPCR), nasal swabs (n=425) for bacterial isolation of possible porcine respiratory disease complex syndrome (PRDC) pathogens were collected. Additionally information about individuals and farm condition was gathered for further analysis. ELISA shows a 30.67 % PRRSV true seroprevalence been more as likely to be seropositives in farms with PRRSV background and vaccination schedule and of urban-semiurban location; pigs were seroreactive for PRRSV in 7/11 farms (63.63 %). Viremia was found through RTqPCR in 2/80 (2.5 %) of the total of pigs sampled for it, and was in 2/11 farms (18.18 %). We found a sow infected with a European PRRSV that did not show any evident clinical signs of infection, and a sow with a North American PRRSV who displayed clinical signs of the disease. Two farms didn't show seropositive or viremic pigs; these two farms had no PRRSV background or PRRSV vaccination schedule and are located in a semirural area. *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus suis* where isolated from all the farms and *Actinobacillus* spp (4/11) or *Pasteurella* spp (3/11) where found less frequently in some farms. This is the first report in México of a European type PRRSV infection.

KEY WORDS: PRRSV, PCR, ELISA, Bacterial isolation, Porcine respiratory disease complex.

Recibido el 15 de noviembre de 2012. Aceptado el 21 de febrero de 2013.

^a Centro de Investigación en Ciencias Médicas de la Universidad Autónoma del Estado de México. Jesús Carranza No. 205 Col. Universidad 50130, Toluca, Méx., México. Teléfono y fax: 52(722) 219 4122, 219 3675. heydeck@hotmail.com. Correspondencia al primer autor.

^b Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma del Estado de México. México.

^c Comité de Fomento y Protección Pecuaria del Estado de México. México.

INTRODUCCIÓN

El PRRS es una enfermedad endémica en la mayoría de los países de producción porcina⁽¹⁾. En México se detectó por primera vez en 1992⁽²⁾. Está más frecuentemente asociada a granjas tecnificadas que a granjas de traspatio⁽³⁾. La primoinfección de la granja puede ocasionar pérdidas significativas y posteriormente reemerger como brote agudo^(4,5). Ocasiona pérdidas de aproximadamente 10 % de la producción anual de lechones⁽²⁾. El virus de PRRS (PRRSV) es un *Arterivirus*; es pequeño y envuelto, con ARN lineal de una cadena, de sentido positivo, de 15 kb, con nueve marcos de lectura abiertos conocidos⁽⁶⁻⁹⁾. Se clasifican en linajes: europeo (tipo I) y norteamericano (tipo II)^(7,8,10); hay una gran diversidad genética entre estos y de cepas norteamericanas (NA), con diferentes propiedades antigénicas, que ocasionan sintomatología similar^(6,10); pudiendo haber una rápida variación o recombinación genética^(11,12).

La vía de entrada es oro-nasal o genital, llega a nódulos linfáticos regionales y se distribuye sistémicamente libre o en los monocitos circulantes, ocasionando leucopenia. Se replica en diferentes órganos y tejidos, pero infecta principalmente a macrófagos alveolares, células dendríticas y monocitos⁽¹³⁾. Ocasiona fiebre, disnea, enrojecimiento de la piel, edema en los párpados, conjuntivitis, depresión, anorexia, diarrea mediana, inadecuada ganancia de peso; disminuye la calidad del semen, aumenta los índices de repeticiones de celo, abortos (a finales de la gestación), momificaciones, nacimientos prematuros, mortalidad en recién nacidos, nacimiento de lechones débiles, y mortalidad de lactantes^(14,15,16); aumenta la frecuencia de problemas respiratorios de cerdos en desarrollo solo, asociado con patógenos bacterianos, o incrementando la frecuencia de otras enfermedades respiratorias^(2,4,5). El PRRSV es una de muchas posibles etiologías de la enfermedad del complejo respiratorio porcino (CRP)⁽¹⁷⁾. Es posible se presente de manera asintomática o tan solo con una

INTRODUCTION

PRRS is an endemic disease in most swine producing countries⁽¹⁾. In Mexico it was first detected in 1992 as an epidemic outbreak⁽²⁾. It is more frequently associated to technified farms than to backyard farms⁽³⁾. In a farm first time infection, it may cause significant economic losses with the possibility of reemerging as an acute outbreak^(4,5). PRRSV causes a loss of about 10 % annual piglet's production⁽²⁾. PRRS virus (PRRSV) is an *Arterivirus*. It is small and enveloped, with a linear single stranded positive sense ARN of 15 kb with 9 known open reading frames (ORF)⁽⁶⁻⁹⁾. It is classified on European (type I) and North American (type II) lineage^(7,8,10). There is a great genetic diversity between them and of North American strains (NA), with different antigenic properties even though the clinical symptomatology they produce is similar^(6,10). Further, more these strains may have quick genetic variations or recombination^(11,12).

PRRSV infection could be oro-nasal or genital. It reaches the regional lymph nodes and then it is distributed systemically, either free or linked to circulating monocytes, causing leucopenia. It is able to replicate in different organs and tissues, but mainly infects alveolar macrophages, dendritic cells and monocytes⁽¹³⁾. It produces fever, dyspnea, redness of the skin, eyelid edema, conjunctivitis, depression, anorexia, median diarrhea, inadequate weight gain; decrease semen quality, increased rates of estrus repetition, abortion (late term), mummification, premature farrowing, stillbirths, weak piglets at birth and preweaned piglet mortality^(14,15,16). Increases the frequency of respiratory problems in growing pigs either alone, in association with bacterial pathogens, or increases the frequency of other respiratory diseases^(2,4,5); PRRSV is one of many possible etiologies of porcine respiratory disease complex syndrome (PRDC)⁽¹⁷⁾. However, PRRSV infection may have an asymptomatic course or just a general symptomatology indistinguishable from other reproductive or respiratory diseases.

sinomatología general indistinguible de otras enfermedades del aparato reproductor o respiratorio. De acuerdo al tipo de virus de PRRS y a la característica respuesta inmunológica individual, podría destruirlo, desarrollar un proceso crónico con diseminación prolongada del virus, inducir una inmunidad de corto plazo con posible nuevo desarrollo clínico de la enfermedad^(4,5), o ser portador con baja viremia y títulos bajos en tejidos limitado a algunos tejidos linfoides, de difícil diagnóstico^(4,5,6); generándose cerdos en diferentes estados de infección en cambio constante, de lo cual depende la estabilidad de la granja^(4,5). La viremia varía según la edad y así el tiempo de transmisión del virus⁽¹⁵⁾, siendo de una a dos semanas en adultos y de 10 a 12 semanas a incluso meses en cerdos jóvenes^(4,5,12), eliminándose por saliva, orina, semen, secreciones mamarias, trasplacental (a partir de la implantación) y quizá excremento^(1,7).

Existe la posibilidad de la activación, recombinación (con cepas de campo) y transmisión de virus de vacunas atenuadas^(10,12). En granjas endémicas con cerdos asintomáticos, el diagnóstico se basa en la combinación de un método serológico como ELISA y una técnica que determine la presencia del virus, su proteína o su ARN y su o sus linajes norteamericano o europeo, para determinar circulación y presencia del virus^(1,6); el aislamiento viral, es un proceso largo (7 a 14 días), las muestras son difíciles de obtener y manejar con algunas cepas de campo difíciles de aislar; el RT PCR es más rápido, detecta infecciones en más muestras y en tiempos más tardíos de infección, el RTqPCR es más sensible, cuantificable, hay menor manejo de muestra que permite mayor rapidez, menor error y un diagnóstico más preciso, incluso para múltiples agentes en un solo tubo⁽⁶⁾.

Se ha reportado la presencia de PRRSV en algunos estados de México^(14,16,18), sin embargo, no hay reportes de referencia acerca de la situación por infección de PRRSV

According to type of PRRS virus and individual immunological characteristic response to it, infection could be cleared, develop a chronic process allowing prolonged viral shedding, induce a short term immunity that allow to develop the clinical diseases again^(4,5), or to stay as carrier with low viraemia and low viral titers on tissues, which is limited to some lymphoid tissues of diagnosis hindering^(4,5,6). Therefore an endemic farm could have different infection status in constant change, from which the farm stability depends^(4,5). The viremia varies according to age and so on transmission time⁽¹⁵⁾, from one to two weeks in adults, or 10 to 12 wk or months in young pigs^(4,5,12). Viruses are shed on saliva, urine, semen, mammary secretions, transplacental (from implantation) via and maybe feces^(1,7).

There is the possibility that attenuated vaccine viruses be activated, had recombination with field virus, and be transmitted^(10,12). In regular bases PRSSV diagnosis is based on a serological method as ELISA, along with a technique to determine viral presence of the virus, virus protein or viral RNA and of one or both (NA or E) lineage present, to determine viral circulation and presence^(1,6). The Viral isolation, have a long diagnostic period (7 to 14 d), diagnosis samples are difficult to obtain and handle and some field strains are difficult to isolate. RT PCR is faster, has been detecting infection in more samples and in later times post infection than viral isolation and RT qPCR has enhanced sensitivity, can quantify and there is a less sample handling that allows a faster, less mistaken and precise diagnosis even for multiple agents in one tube⁽⁶⁾.

PRRSV has already been reported to circulate in several states of México^(2,14,16,18), however, in the State of Mexico, except for a serologic ELISA report in back yard pigs of two municipalities, no reports are available about the involvement of PRRSV infection in technified farms. Therefore, the aim of this work was to determine PRRSV condition in technified farms of the state of México by ELISA and one step

antecedente o actual en el estado de México, excepto ELISA de sueros de cerdos de traspatio de dos municipalidades. Por lo tanto el objetivo de este trabajo fue determinar la condición de PRRSV en granjas tecnificadas del estado de México por ELISA y RTqPCR en un solo paso (determinando linaje), análisis bacteriológico de posibles bacterias del CRP presentes en muestras de hisopos nasales y recopilación de información relacionada a PRRSV y CRP mediante un cuestionario.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

Se realizó un estudio transversal por conglomerados, en una etapa, en cerdos, de abril a septiembre de 2011, sujeto a disponibilidad, cooperación participativa y presupuesto. Las 33 granjas tecnificadas del estado de México tenían un estimado de 77,431 cerdos (N); se realizó una selección al azar por lotería, de 11 granjas que tenían un estimado de 19,353 cerdos. Se determinó el tamaño de muestra considerando un 95% de intervalo de confianza (valor Z), seroprevalencia del 30% (p) o viremia del 3% (p)⁽¹⁴⁾, precisión de error de 0.10 (d), efecto de diseño (D) 2 por conveniencia; se dividió entre 11 granjas para tamaño de muestra para cada conglomerado.

$$n_c = D \left(\frac{n}{1+n} \right) \frac{1}{d^2}; n - Z^2 pq -; q = 1-p^{(19)}$$

Por conveniencia se decidió para cada granja, un muestreo al azar por lotería de 20 cerdos para la circulación viral mediante ELISA y ocho cerdos para la presencia viral mediante RTqPCR, tomados de las etapas productivas de lactación, gestación, engorda y reemplazos (5 y 2 para cada prueba respectivamente). Se tomaron 40 hisopos nasales por granja para aislamiento bacteriológico, procesando por conglomerado de muestras de hisopos de 10 cerdos de cada etapa productiva de la granja. Los animales no fueron vacunados al menos un mes antes de ser muestreados. El estudio transversal para la seroprevalencia verdadera (P)⁽²⁰⁾ de PRRSV

RTqPCR (linaje identificación). Additionally bacteriological analyses were conducted from nasal swab pooled samples, for possible bacterial involvement in PRDC etiology; as well as having information related to PRRSV and PRDC from these farms through a questionnaire.

MATERIALS AND METHODS

Sampling

A cluster cross sectional study on one stage was performed on pigs from April to September 2011, subject to disponibility, participative cooperation, and budget. The 33 technified farms of the State of Mexico had an estimated of 77,431 pigs, a lottery random selection was made of 11 farms which had an estimated of 19,353 pigs. Animal sample size was determined considering a 95% confidence interval, 30% seroprevalence (p) or 3% viremics (p)⁽¹⁴⁾, a 0.10 precision error (d), 2 as design effect (D) by convenience, and a division by 11 farms for conglomerate sample size.

$$n_c = D \left(\frac{n}{1+n} \right) \frac{1}{d^2}; n - Z^2 pq -; q = 1-p^{(19)}$$

By convenience, it was decided a lottery random sampling of 20 pigs for virus circulation by ELISA, and 8 pigs for virus presence by RTqPCR per farm, from the productive stages of lactation, gestation, fattening and replacement (5 and 2 for each test respectively); plus 40 nasal swabs per farm for bacteriological isolation, pools of 10 pig samples per productive stage were processed. Animals included in the present study had not been vaccinated in at least one month before sampling. The PRRSV transversal study for true seroprevalence (P)⁽²⁰⁾ considered a 97.6 % sensitivity (Se) and 98.6 % specificity for ELISA⁽²¹⁾, and although a 100 % sensitivity (Se) and specificity (Sp) for RTqPCR is known^(21,22,23), because of under 100 samples were taken only is referred a proportion instead of an absolute prevalence (Pa):

$$P = \frac{Pa + Sp - 1}{Sp + Se - 1} \quad Pa = \frac{a}{n} \quad a = \text{positive animals} \\ n = \text{animals sampled}^{(20)}$$

consideró una sensibilidad (Se) del 97.6 % y especificidad (Sp) del 98.6 % para ELISA⁽²¹⁾ y aunque se conoce una sensibilidad (Se) y especificidad (Sp) del 100 % para RTqPCR^(21,22,23), al ser menos de 100 muestras por granja la prevalencia absoluta (Pa) sólo se considera como proporción:

$$P = \frac{Pa + Sp - 1}{Sp + Se - 1} \quad Pa = \frac{a}{n} \quad \begin{array}{l} a = \text{animales positivos} \\ n = \text{animales muestreados}^{(20)} \end{array}$$

Se aplicó un cuestionario sujeto a participación cooperativa. Para la asociación de variables a PRRSV se realizaron estudios de casos-testigo, en tablas de contingencia de 2x2, para el 95% de confianza con razón de probabilidades OR (odds ratio), intervalo de confianza del 95%, valores *P* de "ji" cuadrada de asociación sin corrección y con corrección de Yates y de Prueba exacta de Fisher, utilizando el software EPIDAT versión 3.1^(24,25).

ELISA

Los muestreos para ELISA y RTqPCR fueron realizados de manera independiente, sin embargo algunos cerdos resultaron muestreados para ambas pruebas.

Para el análisis serológico con ELISA se colectaron muestras de sangre (n=220: 20 animales/granja) por el personal calificado del Comité de Fomento y Protección Pecuaria del Estado de México (CFPPM) de las 11 granjas, de abril 11 a septiembre 19 del 2011, de cerdos reproductores y reemplazos de más de 11 semanas de edad. Las muestras se tomaron asépticamente por venopunción de la vena cava anterior en cerdos jóvenes o de la vena yugular externa en cerdos mayores, con agujas 21g x 1½" (0.8 x 38 mm) y tubos de 7 ml estériles; las muestras se conservaron alrededor de una hora a temperatura ambiente para después ser transportadas al laboratorio en cajas aislantes a 4 °C. La sangre se centrifugó 5 min a 2,500 rpm, se colectó el suero y se almacenó a 4 °C hasta su análisis. La serología se realizó con el kit para prueba de unión enzimática (ELISA), IDEXX kit HerdChek PRRS 2XR Ab test (Holland),

Also, case-control probability ratio studies (odds ratios) were done^(24,25).

A questionnaire was applied subject to cooperative participation. Case-control studies were done to associate variables to PRRSV, in 2x2 contingency tables, for a 95% confidence, obtaining odds ratio (OR), 95% confidence interval and *P* values of χ^2 association without correction and with Yates correction, and of Fisher's exact test, using EPIDAT software version 3.1^(24,25).

ELISA

ELISA and RTqPCR were performed as independent samplings; however, some animals were sampled for both tests. Blood samples (n=220: 20 animals/farm) were collected for serologic analysis with ELISA by qualified personnel of the Comité de Fomento y Protección Pecuaria del Estado de México (CFPPM) from the 11 farms, from April 11 to September 19, 2011, from breeding stock and replacement pigs over 11 wk old. Samples were aseptically taken by venipuncture of anterior cava vein in young pigs, or from external jugular vein in older pigs with sterile 21g x 1½" (0.8 x 38 mm) and 7 mL BD vacutainer vacuum tube; blood samples were preserved around one hour at room temperature, then transported to the laboratory in styrofoam boxes at 4 °C. Blood was centrifuged for 5 min at 2,500 rpm, serum was collected and storage at 4 °C until analysis. Serology was performed with a commercial enzyme linked immunoabsorbent assay (ELISA) kit, IDEXX kit HerdChek PRRS 2XR Ab test (Holland), catalog No. 99-09418, designed to detect anti-PRRSV IgG antibodies in swine serum and normal host cell (NHC) antigens, following manufacturer instructions. The extent of host cell contribution to the total signal is assessed relating PRRSV activity to NHC reactivity. The presence or absence of antibody to PRRSV is determined by calculating the S/P ratio for each sample, considering positive for PRRSV antibodies, S/P ratio values greater or equal to 0.40, and negative for PRRSV antibodies, S/P

No. de catálogo 99-09418, diseñado para detectar anticuerpos IgG anti-PRRSV en suero de cerdos y antígenos de células normales del hospedero (NHC), siguiendo las instrucciones del fabricante. La presencia o ausencia de anticuerpo anti-PRRSV, se determina calculando el índice S/P para cada muestra, considerando positivo para anticuerpos anti-PRRSV, valores de índice de S/P mayores o iguales a 0.40 y negativos para anticuerpos anti-PRRSV, valores de índice de S/P de menos de 0.40, cálculos realizados con el software xCHECK (USA) version 3.3 de IDEXX.

RTqPCR

En el muestreo para RTqPCR (n= 80), se procuraron ocho muestras por granja (G); algunas muestras no fueron óptimas, resultando siete muestras en G3 y G5, seis muestras en G1 y cuatro muestras en G11. Las muestras fueron de sangre completa tomadas asépticamente de abril 12 a julio 11 de 2011 por el CFPPEM, con el mismo criterio, utilizando tubos de 4 ml y agujas de 21G x 1.5" (0.8 x 33 mm), estériles. Las muestras se guardaron y transportaron en cajas aislantes manteniéndolas a 4 °C por no más de 17 h para su análisis. La extracción de ARN se realizó en el sistema automatizado del MagNa Pure LC 2.0 Roche (Japan), con el kit de extracción MagNa Pure LC RNA Isolation Kit – High Performance, Roche 3542394001 (Mannheim, Germany), siguiendo las instrucciones del fabricante para la lisis externa de 200 µl de muestra (150 µl de sangre, 50 µl PBS1X o solución salina fisiológica de NaCl₂, 3-4 µl Xeno RNA testigo). La pureza y concentración del ARN se evaluó en un NanoPhotometer, Implen (Munich, Germany). El RTqPCR en un solo paso se realizó en un Fast 7500 termocycler, Applied Biosystems (Singapore, USA patented 5475.610, etc.), siguiendo el protocolo estándar para presencia/ausencia en el Software Versión 1.4, para analizar las mezclas de reacción con el kit TaqMan[®] NA and EU PRRSV Reagents, Ambion/Applied Biosystems 4405547 (USA), que diferencia los tipos de PRRSV NA y EU, y el kit

ratio values of less than 0.40, calculated with the xCHECK software (USA) version 3.3, of IDEXX .

RTqPCR

For RTqPCR sampling (n= 80) eight samples per farm (F) were established but some samples were not optimal resulting seven samples on F3 and F5, six samples on F1 and four samples on F11. There were whole blood samples aseptically taken from April 12th to July 11th 2011 by CFPPEM, with same criteria, with sterile 4 mL BD vacutainer K2 EDTA 7.2 mg tubes and 21G x 1.5" (0.8 x 33 mm) BD vacutainer needles. Samples were kept and transported in styrofoam boxes at 4 °C for no more than 17 h until analysis. RNA extraction was carried out in an automated system MagNa Pure LC 2.0 Roche (Japan), with the extraction kit MagNa Pure LC RNA Isolation Kit – High Performance, Roche 3542394001 (Mannheim, Germany), following manufacturers instructions for external lysis of 200 µL of sample (150 µL blood plus 50 µL PBS1X or NaCl₂ physiological solution plus 3-4 µL Xeno RNA control). RNA concentration and purity was evaluated in a NanoPhotometer, Implen (Munich, Germany). One step RTqPCR was performed on a Fast 7500 termocycler, Applied Biosystems (Singapore, USA patented 5475.610, etc.), following the standard protocol for presence/absence in the Software Version 1.4, to analyze the reaction mixtures with the kit TaqMan[®] NA and EU PRRSV Reagents, Ambion/Applied Biosystems 4405547 (USA) that discriminates North American and European type virus and the kit TaqMan[®] NA and EU PRRSV and Xeno[™] RNA Controls Ambion/Applied Biosystems 4405548 (USA). RTqPCR was performed following manufacturer´s instructions in a 25 µL reaction with no more than 100 ng RNA sample template in 8 µL; each run had negative (blank) and positive (NAPRRSV, EUPRRSV, Xeno RNA control at 20 copies/µL ea) control reactions. The hydrolysis TaqMan probes indicate their correspondent positives samples been detected on their corresponding channels

TaqMan[®] NA and EU PRRSV and Xeno[™] RNA Controls Ambion/Applied Biosystems 4405548 (USA), siguiendo las instrucciones del fabricante para el RTqPCR en un solo paso, en una reacción de 25 µl, con no más de 100 ng de templete de ARN (60 a 80 ng) muestra en 8 µl; cada corrida tuvo sus reacciones de testigo negativo (blanco) y testigo positivo (NAPRRSV, EUPRRSV, Xeno RNA testigo, 20 copias/µl cada uno). Las sondas de hidrólisis TaqMan indicaron a sus correspondientes muestras positivas, detectándolas en sus canales correspondientes de 520 nm para PRRSV NA con FAM[™] dye detector; 550 nm para PRRSV EU con VIC[™] dye detector para Cal Fluor Orange 560 dye; 670 nm para Xeno RNA Control con Cy[™] 5 dye detector para Quasar 670 dye; con ROX dye como referencia pasiva (610 nm).

Cultivo bacteriológico de muestras de hisopos nasales

Para los aislamientos bacteriológicos el personal de CFPPM colectó hisopos nasales (n= 425) con el mismo criterio, de abril 11 a agosto 1° de 2011. Fueron cuarenta y un conglomerados de muestras (10 hisopos cada uno) de las cuatro etapas productivas de cada granja; una de las granjas (G3) sólo tuvo un conglomerado de muestras (40 hisopos) para las cuatro etapas. Las muestras se guardaron a 4 °C para su transporte. Los cultivos bacterianos y todo el trabajo bacteriológico desde su inicio, cultivo e identificación de bacterias se realizó siguiendo los procedimientos estándares para identificar bacterias del CRP⁽²⁶⁾. Cada conglomerado de muestras fue sembrado en agar McConkey y en agar sangre (10% sangre ovina) para ser incubados durante la noche a 37 °C. También fueron sembradas en agar sangre (10% sangre ovina) con una línea central de colonias nodrizas de *Staphylococcus epidermidis* e incubadas durante la noche en ambiente micro anaeróbico a 37 °C. Después de su cultivo, las colonias se sometieron a las pruebas bioquímicas de rutina para caracterizar las bacterias.

Se aplicó un cuestionario a los encargados de las granjas, de agosto a octubre de 2011.

of 520 nm for PRRSV NA with FAM[™] dye detector as reporter and BHQ-1 dye as quencher; 550 nm for PRRSV EU with VIC[™] dye detector for Cal Fluor Orange 560 dye as reporter and BHQ-1 dye as quencher; 670 nm for Xeno RNA Control with Cy[™] 5 dye detector for Quasar 670 dye as reporter and BHQ-2 dye as quencher; with ROX dye as passive reference (610 nm).

Bacteriological isolation from nasal swab samples

For bacteriological isolation, nasal swabs (n= 425) were collected with the same criteria by CFPPM personnel, from April 11th to August 1st 2011. Forty one "pools" (10 swabs each) from the four production farm stages. One farm (F3) had just one pool (40 swabs) from the four stages. The samples were kept at 4 °C for transportation. Bacteriology was quantified by culture and all bacteriological work, including setup, culture, and identification was done following standard operating procedures outlined elsewhere for PRDC bacteria's⁽²⁶⁾. Each "pool" was seeded in agar McConkey and blood agar (10% ovine blood) to be incubated overnight at 37 °C. Samples were also seeded in blood agar (10% ovine blood) with a central line of nurse colonies of *Staphylococcus epidermidis* and incubated overnight in a micro anaerobic environment overnight at 37 °C. After culture, colonies were submitted to routine biochemical tests to characterize bacteria.

A questionnaire was applied to the farm managers from August to October 2011. Farms records are updated manually by production stage on daily bases. Previous analysis had shown that all farms were seronegative to Aujesky. All farms with exception one (F1) vaccine against porcine parvovirus, leptospirosis, and swine erysipelosis.

RESULTS

ELISA results revealed a true prevalence of 30.67 % of serum with antibodies against

Análisis previos mostraron a las granjas seronegativas a Aujeszky. Todas las granjas a excepción de una (F1) vacunan contra parvovirus porcino, leptospirosis y erisipela porcina.

RESULTADOS

Los resultados por ELISA revelaron una prevalencia verdadera de 30.67 % en suero por anticuerpos anti-PRRSV en la población estudiada (30.90 % prevalencia absoluta) (Cuadro 1); 7 de 11 granjas fueron seropositivas en el Norte y Noreste del estado (Figura 1) en un rango de proporciones por granja de 15 a 100 % (0.3090 promedio, 0.30 mediana), una con el 15 % y valores de 0 % en cuatro granjas.

Los resultados por RTqPCR mostraron la presencia del virus de PRRS en sangre en una proporción de 2/80 (2.5 %) de los cerdos estudiados. Dos de las 11 granjas estudiadas tuvieron una cerda virémica cada una; la granja 3 (F3) tuvo una cerda infectada con PRRSV

in the population studied (30.90 % apparent positive prevalence) (Table 1); 7 of 11 farms were seropositive in North and Northeast of the State, (Figure 1), in a rank of proportions per farm of 15 to 100 % (0.309 average and 0.30 median), one with 15 % and 0 % values in four farms.

RTqPCR results showed presence of PRRSV virus in blood of 2/80 (2.5 %) of pigs studied (Table 1). Two of the 11 farms studied had one viremic sow each; farm 3 (F3) had one sow infected with European PRRSV; farm 9 (F9) had one sow infected with North American PRRSV in an average proportion of 13.39 % of viremics in this positive farms, which were seronegatives (Table 1).

A proportion of 81.81 % (9/11) of farms were PRRSV affected. From these 4/11 (36.36 %) farms had PRRSV outbreak history and its control by PRRSV vaccination schedule (PRRSVhv) establishment, and only anti-PRRSV serum antibodies were detected; 3/11 (27.27 %) farms had no PRRSV outbreak history and no

Cuadro 1. Resultados generales de ELISA y RTqPCR para PRRSV de cerdos de más de 11 semanas de edad de granjas tecnificadas del Estado de México. 2011

Table 1. ELISA, RTqPCR PRRSV general results from pigs over 11 wk old from Mexico State technified farms. 2011

Farm	ELISA +/n	Seropositive AP	RTqPCR +/n	Viremic AP	Pathogenic bacteria isolation per pool	Farm population
F9**R	0/20	0	1**NA/8	0.125**	<i>Strep. suis</i> 4/4, <i>Staph. aureus</i> 2/4.vC.	2,474
F3**R	0/20	0	1*EU/7	0.14*	1/1 (1 pool of 40): <i>Strep. suis</i> , <i>Staph. aureus</i> , <i>Past. spp.</i> *	1,264
F10* U	14/20	0.7*	0/8	0	<i>Strep. suis</i> 3/4, <i>Staph. aureus</i> 3/4.	473
F5* SR	8/20	0.4*	0/7	0	<i>Strep. suis</i> 2/4, <i>Staph. aureus</i> 2/4, <i>Past. spp.</i> * 2/4. vRCb (¿), vC.	549
F7* SR	3*/20	0.15*	0/8	0	<i>Strep. suis</i> 3/4, <i>Staph. aureus</i> 4/4. vRCb (¿).	97
F6 V, SU	20/20	1	0/8	0	<i>Strep. suis</i> 2/4, <i>Staph. aureus</i> 2/4, <i>Actinob. spp.</i> * 1/4. vRCb?, vC?.	4,383
F1 V, U	9/20	0.45	0/6	0	<i>Strep. suis</i> 2/4, <i>Staph. aureus</i> 3/4, <i>Past. multocida</i> * 1/4, <i>Actinob. spp.</i> * 4/4. vRCb(MHPA), vC.	447
F8 V, SR	8/20	0.4	0/8	0	<i>Strep. suis</i> 2/4, <i>Staph. aureus</i> 2/4. vRCb?, vC?.	1,454
F2 V, R	6/20	0.3	0/8	0	<i>Strep. suis</i> 2/4, <i>Staph. aureus</i> 4/4, <i>Actinob. spp.</i> * 1/4. vRCb (MHPB), vC.	3,788
F11 SR	0/20	0	0/4	0	<i>Strep. suis</i> 2/4, <i>Staph. aureus</i> 2/4. vRCb (MHPB) vC	2,542
F4 SR	0/20	0	0/8	0	<i>Strep. suis</i> 1/4, <i>Staph. aureus</i> 4/4, <i>Actinob. spp.</i> * 1/4. vRCb?, vC?.	1,882
T=11	T= 68*/220	T= 0.309*	T= 2*/80	T= 0.025**	T= 41 "pools": 24/41 <i>Strep. suis</i> , 29/41 <i>Staph. aureus</i> , 7/41 <i>Actinob. spp.</i> 4/41 <i>Past. spp.</i>	T= 19,353

F= farm; V=porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccination schedule/history; U= urban location; SU= semi-urban; R= rural; SR= semi-rural; n= total pigs sampled; AP= absolute prevalence or proportion; vRCb= porcine respiratory diseases complex syndrome bacteria vaccination schedule; ?= didn't answer; (MHPAB)= *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, (¿)= didn't answer against which bacteria; vC= circovirus vaccination schedule; *, **= risk; *Strep.*= *Streptococcus*; *Staph.*= *Staphylococcus*; *Actinob.*= *Actinobacillus*; *Past.*= *Pasteurella*. All have vaccination schedule against Parvovirus-Leptospira-Erisipela except F1.

europeo; la granja 9 (G9) tuvo una cerda infectada con el PRRSV norteamericano, con una proporción aproximada de virémicos del 13.39 % en estas granjas positivas, las cuales fueron seronegativas.

Una proporción del 81.81 % (9/11) de las granjas estuvieron afectadas por PRRSV. De éstas 4/11 (36.36 %) tenían antecedentes de brote de PRRSV y su control mediante calendario de vacunación establecido contra PRRSV (PRRSVav) y sólo mostraron anticuerpos anti-PRRSV; 3/11 (27.27 %) granjas no tenían antecedentes de brote de PRRSV ni calendario de vacunación contra PRRSV (NoPRRSVav) y sólo mostraron anticuerpos anti-PRRSV; en 2/11 (18.18 %) granjas NoPRRSVav, sólo se detectó ARN viral. Únicamente dos granjas (18.18 %, F4 y F11), NoPRRSVav, se mostraron libres de PRRSV al no detectarse anticuerpos o ARN viral (Cuadro 1).

En todas las granjas se aislaron bacterias potencialmente patógenas. La más frecuentemente aislada fue *Staphylococcus aureus* en una proporción del 70.73 % (29/41) de los conglomerados de muestras, seguida de algunos microorganismos bacterianos primarios causantes de CRP: 58.53 % *Streptococcus suis*, 17.07 % *Actinobacillus* spp (como posibilidad de *A. pleuroneumoniae* y *Haemophilus parasuis*), 9.75 % *Pasteurella* spp (como posibilidad de *P. multocida*; incluyendo la granja con la cerda con PRRSV EU); las cuales se presentaron en diferentes combinaciones en los conglomerados de muestras de la granja, nunca faltando *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus suis* (staph-strepto) en las granjas (Cuadro 1).

Durante el presente estudio ninguna de las granjas mencionó algún brote de PRRS, alguna de sus manifestaciones clínicas o problemas respiratorios de consideración. En todas las granjas se aplica el criterio de un bajo uso de la monta natural como un conocido factor de riesgo^(16,18).

Las granjas con serologías positiva a PRRSV tuvieron viremias negativas, lo cual es

PRRSV vaccination schedule (NoPRRSVhv), and only anti-PRRSV serum antibodies were detected; on 2/11 of farms (18.18 %) which had NoPRRSVhv and only viral RNA was detected. In two farms (18.18%, F4 and F11) which had NoPRRSVhv, no antibodies or viral RNA were detected (Table 1).

Potentially pathogenic bacteria were found in all farms. *Staphylococcus aureus* was the most frequently found, been on 70.73 % (29/41) of the "pools", followed by some of the primary bacterial microorganisms involved in PRDC: 58.53 % *Streptococcus suis*, 17.07 % *Actinobacillus* spp (as possibility of *A. pleuroneumoniae* and *Haemophilus parasuis*), 9.75 % *Pasteurella* spp (as a possibility of *P. multocida*; including EUPRRSV sow farm); which were in different combinations in the "pools" of the farm, never missing *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus suis* (staph-strepto) in the farms (Table 1).

During the present study, none of the farms mentioned a well established outbreak or clinical manifestation of PRRS or respiratory problems of consideration. Low level of natural breeding use was applied in all farms as a known risk factor^(16,18).

The farms with PRRSV positive serologies had only negative viremics what is considered exposed with open question of infection. From this farms F1 (9/20), F2 (6/20), F6 (20/20) and F8 (8/20) had history of PRRSV outbreak and decided to control it coexisting with it through PRRSV vaccination schedule on "blanket" until now, so this exposition is under protection (Table 1). F10 (14/20), F5 (8/20) and F7 (3/20) said not having history of PRRSV and do not vaccinate against it, what indicates a potentially infected population on a higher risk.

The only two farms with a declared positive viremia by viral RNA detection in blood of one sow each, F3 and F9 had negative serologies. None vaccinates against PRRSV and neither against PRDC bacteria, besides staph-strepto

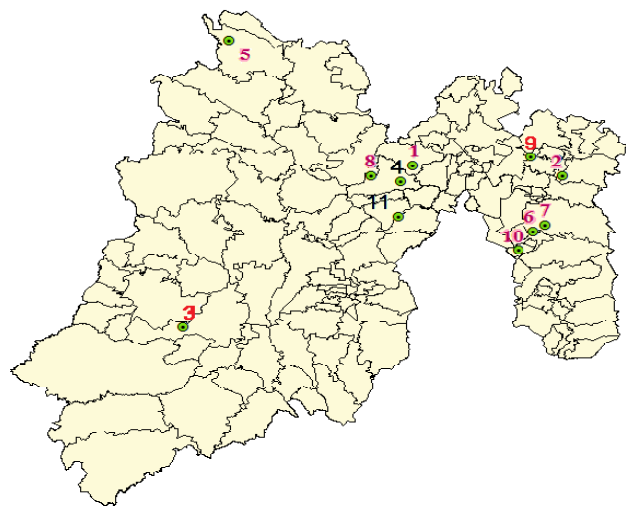
considerado exposición con pregunta abierta a infección. De estas granjas las granjas F1 (9/20), F2 (6/20), F6 (20/20) y F8 (8/20) tienen antecedentes de brote de PRRSV y han decidido controlarlo coexistiendo con el virus mediante calendarios de vacunación contra PRRSV en "sábana", por lo que esta exposición es bajo protección (Cuadro 1). F10 (14/20), F5 (8/20) y F7 (3/20) dijeron no tener antecedentes de PRRSV y no vacunar contra éste, lo que indica una población potencialmente infectada en alto riesgo.

Las únicas dos granjas con viremia positiva declarada por la detección de ARN viral en la sangre de una cerda cada una, F3 y F9, tuvieron serologías negativas; (Cuadro 1) ninguna vacuna contra PRRSV y tampoco contra bacterias del CRP, además de staph-strepto sólo en F3 se aisló *Pasteurella* spp. F3 está ubicada al suroeste del estado (Figura 1) y es la única granja con antecedente de erradicación de PRRSV (2007); hasta ahora repuebla con cerdos libres de PRRSV procedentes de Sonora, sin tener brotes de PRRSV hasta la fecha, manteniendo buenos índices; la cerda virémica fue RTqPCR positiva a PRRSV europeo (PRRSVEU) y ELISA seronegativa, lo que es considerado infección aguda; fue comprada en diciembre de 2010, cuarentenada e inseminada en julio 27 de 2011 y para agosto continuaba preñada sin mostrar ningún signo o síntoma; esta población es considerada altamente expuesta a infección con un virus que no se mostró altamente patógeno. F9 está ubicada en el noreste (Figura 1), dijo no tener antecedentes de brote de PRRSV en ese lugar que rentaban desde 3 años antes y desconocían si lo hubo antes en ese lugar, pero en su sucursal donde producen el alimento sí tenían antecedentes de brote de PRRSV; frecuentemente insemina con semen de Tlaxcala, Hgo., tiene aceptables instalaciones y manejo de la granja y poco manejo de sus registros; de manera general en la granja sólo habían percibido una ligera y constante tos en maternidad; la cerda virémica fue RTqPCR positiva a PRRSV

only in F3 was isolated *Pasteurella* spp (Table 1). F3 is located in the Southwest area (Figure 1) is the only one with history of PRRSV outbreak eradication (2007); until now restocks with PRRSV free pigs from Sonora, without having PRRSV outbreaks to date keeping good rates; the viremic sow was European PRRSV (EUPRRSV) RTqPCR positive (Table 1) and ELISA seronegative, what is considered as acute infection, it was bought on December 2010, quarantined and inseminated after on July 27th 2011 and by the end of August it was still on pregnancy without showing any sign or symptom; this population is considered highly exposed to infection with a virus that had not been show high pathogenicity. F9 is located on the Northeast area, (Figure 1) said that had no history of PRRSV outbreak on the place which they rented since 3 yr before and had not

Figura 1. Localización de granjas tecnificadas del Estado de México con sus resultados de PRRSV. Granjas RTqPCRpositivas: 3 y 9; granjas ELISA positivas: 1, 2, 5, 6, 7, 8, 10; granjas negativas a PRRSV: 4 y 11

Figure 1. Mexico State technified farms location with PRRSV results. Numbers 3 and 9, RTqPCR positive farms, 1, 2, 5, 6, 7, 8, 10, ELISA positive farms; 4 and 11, negative farms



Farm (F) number with outbreak reports: F1 1996 and 2007; F2 2005; F3* 2007; F6 2008; F8 2010; which have a coexisting control by vaccination schedule on "blanket", except F3* which had an eradication control by animal elimination, disinfection and 6 mo rest.

norteamericano (PRRSVNA), (Cuadro 1) no tuvo ELISA pero todos los resultados de ELISA de la granja fueron negativos, por lo que muy probablemente fue una infección aguda que la cerda mostró activa con una repetición de celo seguido de un aborto y posteriormente dos repeticiones de celo, por lo que fue enviada a rastro; esta granja fue considerada altamente expuesta a infección y brote.

Sólo dos granjas se mostraron libres de PRRSV con serologías y viremias negativas, F11 y F4, ambas ubicadas en un área semi rural, sin antecedentes de PRRSV ni calendarios de vacunación contra éste (Cuadro 1, Figura 1). F11 nunca introduce cerdos de origen externo y es la granja con menor uso de semen de origen externo (cuatro veces al mes) y tan sólo de un origen.

Se encontró una relación entre la seropositividad a PRRSV y ubicación urbana-semi urbana, siendo 12.65 veces la probabilidad (OR 13.65) de ser seropositivos en granjas de ubicación urbana-semi urbana que en granjas de ubicación rural-semi rural, IC 6.74 a 27.65 y X^2 0.001. También se encontró una relación de seropositivos a PRRSV con granjas con antecedentes de PRRSV, que desde entonces han controlado con calendario de vacunación a PRRSV (PRRSVav), siendo de 4.35 veces (OR 5.34) la probabilidad de ser ELISA seropositivos siendo de granjas PRRSVav que siendo de granjas sin antecedentes de PRRSV (o antecedente erradicado o dudoso), las cuales no tienen calendario de vacunación a PRRSV (NoPRRSVav), IC 2.88 a 9.90 y X^2 Pearson $P < 0.001$. Para asociar otras variables de exposición, a falta de información en varias granjas se consideró como más conveniente tomar datos únicamente de granjas sin antecedentes (o erradicado o dudoso), las cuales no presentaban calendario de vacunación (a excepción de F4 por tener información incompleta), y se asociaron con la positividad a PRRSV por una o ambas pruebas de ELISA y RTqPCR como variable de respuesta, las posibles

knowledge about the place before them, but on their branch where they produce their food had history of PRRSV outbreak; F9 frequently does insemination with semen from Tlaxcala, has fear control on its management, installations and few on records; generally in the farm they only had perceived a slight and constant cough in maternity; the viremic sow was North American PRRSV (NAPRRSV) RTqPCR positive (Table 1), it didn't had ELISA, but all ELISA results from this farm were negative, been probably for an acute infection that this sow showed active, with an estrus repetition followed by an abortion and then two estrus repetition, for what was sent to the slaughterhouse; so the farm is considered highly exposed to infection and outbreak.

Only two farms showed PRRSV free with negative serologies and viremias, F11 and F4, both are in a semi rural area, with no history of PRRSV and that do not vaccinate against it (Table 1, Figure 1). F11 never introduce external origin animals and is the farm with the lowest use of external origin semen (4 times a month) and only from one resource.

It was found a relationship between PRRSV seropositivity and urban-semi urban location, been 12.65 times as likely to be (OR=13.65) seropositives from farms of urban-semi urban location than from rural-semirural location, CI 6.74 to 27.65, X^2 Pearson's $P < 0.001$. It also was found a relationship between PRRSV seropositivity and PRRSV history-PRRSV vaccination schedule control (PRRSVhv), been 4.35 times (OR= 5.34) as likely to be ELISA seropositive been from farms PRRSVhv than been from farms with no PRRSV history and no PRRSV vaccination schedule (NoPRRSVhv), CI 2.88 to 9.90, X^2 Pearson's $P < 0.001$. Because of incomplete information in many farms, to associate another exposition variables, it was considered convenient to take dates only from farms with no PRRSV history (or eradicated or doubted history) and no PRRSV vaccination schedules (No PRRSVhv) except F4 (because of incomplete information) and there were associated with PRRSV positivity by one or both

variables de exposición y que mostraron asociación significativa fueron: Introducción de uno (semental) o más animales externos o inseminación $\geq 50\%$ con semen de origen externo, OR 4.05, IC 1.14 a 14.31, χ^2 Pearson $P < 0.020$ (Fisher ex. un. 0.01), al estratificarlo, únicamente de animales externos OR 6.12, IC 1.62-23.11, introducción de animales externos e inseminación $\geq 50\%$ con semen de origen externo OR 5.62, IC 1.33-23.77, únicamente inseminación $\geq 50\%$ con semen de origen externo OR 0.48, IC 0.04-4.94; agua $\geq 20\%$ de bordos (acceso animales trashumantes) y pipas o únicamente $\geq 20\%$ pipas, OR 0.38 IC 0.15-0.92, no mostró riesgo, χ^2 0.029 (Yates corr 0.049) mostró ligera asociación, IC al estratificarlo sólo mostró riesgo a bordos (acceso animales trashumantes) y pipas OR 1.20.

Los resultados individuales de los cerdos (n= 266) relacionados con los resultados de las granjas muestran a un 26.32 % de la población

tests of ELISA and RTqPCR as response variable, the possible exposition variables and with significant association were: Introduction of one (stallion) or more external animals and/or $\geq 50\%$ of insemination with external origin semen, OR 4.05, CI 1.14 to 14.31, $P < 0.020$ Pearson's χ^2 (0.01 Fisher ex. un.), at stratification of only of external animals OR 6.12, CI 1.62-23.11, external animals introduction and $> 50\%$ of insemination with external origin semen OR 5.62, CI 1.33-23.77, only $\geq 50\%$ of insemination with external origin semen OR 0.48, CI 0.04-4.94; $\geq 20\%$ of water from rainwater reserves (transhumant animals access) and hookahs and/or only $\geq 20\%$ of water from hookahs, OR 0.38 IC 0.15- 0.92, didn't show any risk, $P < 0.029$ Pearson's χ^2 (0,049 Yates corr) showed a light association, at stratification only $\geq 20\%$ of water from rainwater reserves (transhumant animals access) and hookahs showed risk OR 1.20.

Individual pig's results (n= 266) related to farm results show a 26.32 % of the population

Cuadro 2. Resultados Individuales de ELISA y RTqPCR Para PRRSV, de cerdos (> 11 semanas de edad) de granjas tecnificadas del Estado de México. 2011

Table 2. ELISA, RTqPCR PRRSV individual pig results (pigs over 11 wk old) from Mexico State technified farms. 2011

Farm	ELISA+/ RTqPCR+	ELISA-/ RTqPCR+	ELISA+/ RTqPCR-	ELISA-/ RTqPCR-	ELISA +	ELISA -	RTqPC R +	RTqP CR -	Pigs Sampled
F9**R	0	0	0	1	0	19	<u>1**NA</u>	6	27
F3**R	0	1**EU	0	0	0	19	0	6	26
F10*U	0	0	6*	2	8*	4	0	0	20
F5* SR	0	0	0	1	8*	11	0	6	26
F7* SR	0	0	3*	4	0	13	0	1	21
F2 V,R	0	0	2	3	4	11	0	3	23
F8 V,R	0	0	0	0	8	12	0	8	28
F1 V,U	0	0	3	2	6	9	0	1	21
F6 V,SU	0	0	0	0	20	0	0	8	28
F11 SR	0	0	0	4	0	16	0	0	20
F4 SR	0	0	0	2	0	18	0	6	26
T=11	0	<u>T= 1*</u>	T= 14*	T= 19	T= 54*	T= 132	<u>T= 1**</u>	T= 45	T = 266
		<u>0.003759*AP</u>					<u>0.003759**AP</u>		

0+1+14+19=34 ELISA/RTqPCR PRRSV= 0.12781 AP

F= farm; V= porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccination schedule/history; U= urban location; SU= semi urban; R= rural; SR= semi rural; AP= absolute prevalence or proportion; *, **= risk. All have vaccination schedule against Parvovirus-Leptospira-Eriscipela except F1.

estudiada serológica o viralmente afectada, 56.39 % en algún nivel de riesgo y al 17.29 % libre (Cuadro 2, Figura 2) lo que se explica como: 0.75 % con viremia declarada y 19.17 % en alto riesgo por no estar en un calendario de vacunación contra PRRSV, de las granjas F3 y F9; en contacto con PRRSV sin la protección de un calendario de vacunación contra PRRSV un 9.4 % y en riesgo medio 15.79 %, de F10, F5 y en menor grado F7; en contacto con PRRSV estando con calendario de vacunación contra PRRSV 16.17 % y en bajo riesgo 21.43 % F1, F2, F6 y F8; una población libre de PRRSV del 17.29 % de F4 y F11 (Figura 2).

DISCUSIÓN

A nuestro conocimiento, este es el primer reporte a cerca de la circulación viral de PRRSV (30.67 % seroprevalencia verdadera) y detección viral (2/80) en el estado de México,

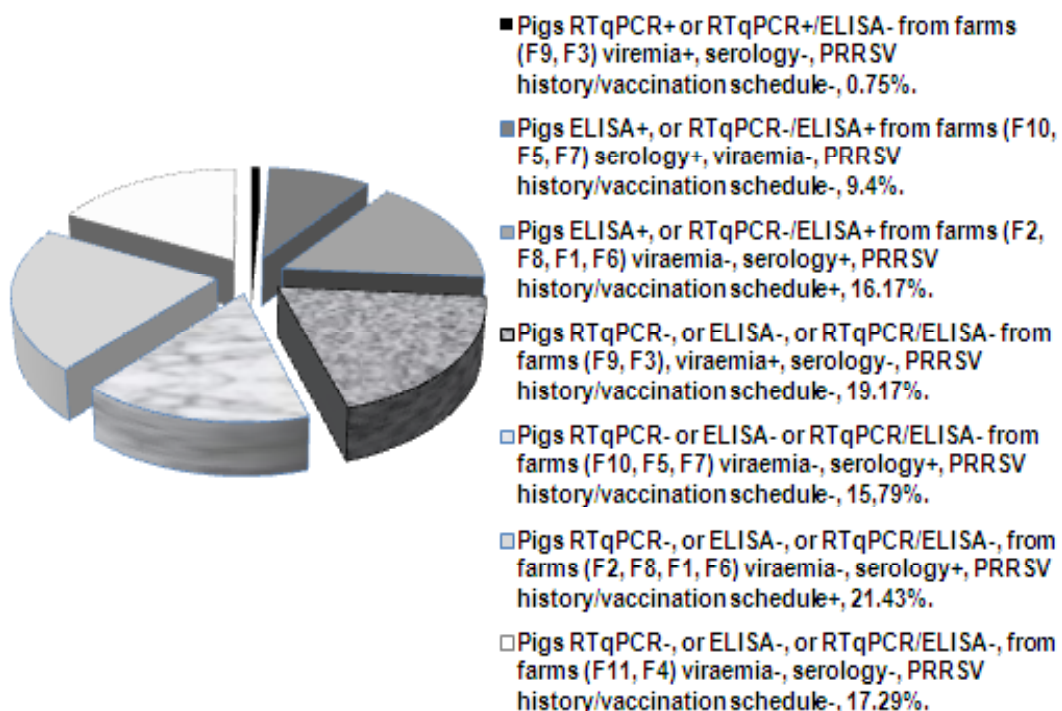
studied serologically or virally affected, 56.39% at some level of risk and a 17.29 % free.(Table 2, Figure 2) Explained as: declared viremia 0.75 % and in a high risk 19.17 % because they are not on a PRRSV vaccination schedule from F3 and F9; in contact with PRRSV with no PRRSV vaccination schedule protection 9.4 % and in median risk 15.79 % from F10, F5 and with less level from F7; in contact with PRRSV been in a PRRSV vaccination schedule 16.17 % and in a low risk 21.43 % from F1, F2, F6 and F8; A PRRSV free population of 17.29 % from F4 and F11 (Figure 2).

DISCUSSION

To the best of our knowledge, this is the first report about PRRSV viral circulation (30.67 % true seroprevalence) and viral detection (2/80) in concern to the State of México, and by ELISA and RTqPCR, with the first report of a EUPRRSV

Figura. 2. Relación de resultados de diagnóstico de PRRSV de los cerdos (266) y sus granjas (11) tecnificadas del Estado de México

Figure 2. PRRSV results of pigs > 11 wk old (266) with its technified farms (11) from Mexico State



por ELISA y RTqPCR, con el primer reporte de una infección por PRRSVEU en México. La mayoría de las granjas (81.81 %; 9/11), se mostraron positivas a PRRSV pero no hubo signos evidentes de infección en las granjas, a pesar de bacterias aisladas posibles causantes de CRP. Los posibles tipos de PRRSV presentes no se manifestaron como un brote agudo, sino como una enfermedad controlada subclínica y endémica, que puede notarse principalmente en repeticiones de celo que podrían deberse a reabsorción embriónica (notado por F2 utilizando ultrasonido), en abortos esporádicos y en algunos problemas respiratorios ligeros.

La presencia de PRRSV, el aislamiento bacteriológico de posible etiología de CRP y los signos de estas enfermedades estuvieron influenciados por las instalaciones de la granja, control sanitario, supervisión médica, programas de medicina preventiva y el tipo o tiempo de uso de calendarios de vacunación, como factores clave⁽²⁷⁾. En las granjas PRRSVav, los calendarios de vacunación contra PRRSV (además de otros factores clave), disminuyó el número de cerdos virémicos, signos, síntomas, tiempo de viremia y tiempo de diseminación viral, muy probablemente detectamos anticuerpos contra virus de campo antecedente, virus vacunal activo y algunos virus de campo nuevos^(7,10,12), sabiendo que hasta ahora las vacunas del mercado no garantizan una protección satisfactoria, su eficiencia decae frente a tipos heterólogos y de la posibilidad de una prevalencia de virus vacunal del 10 % y sobre el 33 %⁽¹⁰⁾, confirmación sólo posible mediante la secuenciación del ARN viral de PRRSV y estudios realizando alineaciones y dendogramas (filograma, dendograma radial) en las cepas de PRRSV mexicanas para diferenciar el virus de campo residente, virus vacunal o la introducción de un nuevo virus, no siendo aún probada la relación entre la secuenciación del virus y las características del virus principalmente en cuanto a patogenicidad⁽²⁸⁾.

La presencia de anticuerpos anti-PRRSV fue más probable en granjas con PRRSVav y en un área

infección en México. Most farms (81.81 %; 9/11), showed positive to PRRSV but no signs of infection were evident on the farms, despite some PRDC etiology bacterial isolations. The possible types of PRRSV present didn't manifest as an acute outbreak and instead as an endemic sub clinic controlled disease, that might be noticed mostly on estrus repetitions that could be due to embryo resorptions (as noticed by F2 with ultrasound), on sporadic abortions and in some light respiratory problems.

The presence of PRRSV, bacterial isolation of possible PRDC etiology and this diseases signs were influenced by the kind of farm facilities, sanitary conditions, medical surveillance, preventive medicine programs and the kind of vaccination schedules use or time of use, as key factors⁽²⁷⁾. In PRRSVhv farms, PRRSV vaccination schedules (plus other key factors) diminished viremic pigs, signs, symptoms, viremia time and viral spread time. We might detected antibodies against history field virus, vaccine virus activity and a few new field virus^(7,10,12), knowing that until now market vaccines do not guarantee a satisfactory protection; its efficiency drops in front of an heterologus type and the possibility of a vaccine virus prevalence of 10 % and over 33 %⁽¹⁰⁾, confirmation only possible by the viral PRRS RNA sequencing and phygenetic studies on PRRSV Mexican strains, to differentiate resident field virus, vacunal virus or new introduced virus, not been proved yet a relationship between virus sequencing and virus characteristics mainly in virus pathogenicity⁽²⁸⁾.

Anti-PRRSV antibodies were more associated to farms with PRRSVhv and of urban-semi urban location with a highest association to semi urban location at stratification as it could be observed in F6 (20/20) and of urban location on F1 (9/20). On F10 (14/20), farm of urban location, no PRDC bacterial vaccination, NoPRRSVhv, is interesting to observe that despite a high anti-PRRSV antibody seroprevalence there was no PRRSV RNA detection, and no evidence of persistent either present or past reproductive

urbana-semi urbana que al estratificar tiene mayor asociación a semi urbana como se observa en F6 (20/20) y urbana en F1 (9/20). En F10 (14/20), granja en área urbana, sin calendario de vacunación contra CRP, NoPRRSVav, es interesante notar que a pesar de una alta proporción de seropositivos con anticuerpos anti-PRRSV no se detectó ARN de PRRSV, ni tampoco se observaron evidencias de problemas reproductivos o respiratorios persistentes asociados a PRRSV o CRP, lo cual probablemente podría explicarse por una alta calidad de las instalaciones de la granja, el uso de probióticos (ambos de los cuales no se tienen en las otras granjas), el manejo de la granja⁽²⁷⁾, y quizá a una baja patogenicidad del virus, concordando con otras en las asociaciones más altas de introducción de un semental de origen externo y ubicación urbana.

En la aplicación de cuestionarios, la mayoría de las granjas cooperó positivamente pero no todas completamente, y los registros de las granjas son llevados manualmente a diario por etapas productivas, pero en la mayoría toma demasiado tiempo para ser descargados individualmente, anualmente y electrónicamente; esto limitó los datos para más análisis estadísticos y el número de granjas, no siendo suficiente para una regresión logística múltiple.

La infección por PRRSV puede confundirse o estar en asociación con otras enfermedades como son influenza suina, enfermedad de Aujeszky, fiebre porcina clásica, parvovirus porcino, encefalomiocarditis, clamidiosis o micoplasmosis⁽²⁾. Un ejemplo de este tipo de infección pudo pasar en F5 (8/20), en donde los cerdos pudieron tener contacto con un virus de PRRSV que aparentemente controlaron mediante diferentes factores individuales y generales, y la infección confundirse o estar en asociación con otras enfermedades.

Por la influencia positiva de factores generales, la cerda positiva a PRRSVNA (F9) fue eliminada por el manejo general debido a síntomas de

or respiratory problems associated to PRRSV or PRDC were observed, which could be probably explained by high quality farm facilities and maybe so to the use of probiotics, both of them absent in the other farms⁽²⁷⁾, to a good management and maybe to a low pathogenic PRRSV, agreeing with other farms on an external origin stallion introduction and of urban location, been both variables of the highest association.

The questionnaire application had a positive cooperation in most of farms, but was not complete in all of them. The information is manually registered on a daily basis and by production area, but in most of them, it takes too long to be discharged, individually, annually and electronically. All of these, give a limitation on dates access for more statistical analysis and on the number of farms, not been enough for a multiple logistic regression analysis.

PRRSV infection can be confused or in association with other diseases such as swine influenza, Aujeszky disease, classic swine fever, porcine parvovirus, encefalomiocarditis, clamidiosis or micoplasmosis⁽²⁾. An example of this kind of infection could be happen on F5 (40 %) where pigs may had contact with a PRRSV virus that they were apparently controlling through different individual and general factors, and the infection be confused or in association with other disease.

By the influence of general positive factors, the NA PRRSV positive sow (F9) was eliminated by general management because of symptoms of estrus repetition, abortion and two estrus repetitions (maybe resorptions); F11 (PRRSV negative farm) never introduce external origin pigs (PRRSV associated risk factor) and is the one with less use of semen of external origin. It seems that as weakness on general factors as negative influences to a PRRSV presence, is a possibility for lack of good quality care on external resources of water on F5 (8/20 PRRSV sera positives, NoPRRSVhv, significance ≥ 20 % of water from rainwater reserves of transhumant animals access and hookahs) of food on F9

repetición de celo, aborto y dos repeticiones de celo (quizá reabsorciones); F11 (granja PRRSV negativa) nunca introduce cerdos de origen externo (factor asociado a PRRSV) y es la que menos usa semen de origen externo. Presentaciones de fallas en factores generales parecen influenciar la posible presencia de PRRSV, siendo una posibilidad de deficiencias en una buena calidad de cuidado en recursos externos para agua en F5 (8/20 PRRSV seropositivos, NoPRRSVav, agua de bordo de acceso de animales de granja trashumantes y de pozo, significativo), de alimento en G9 (RTqPCR positiva a PRRSVNA), de semen de origen externo en algunas granjas pero principalmente por su uso en alta frecuencia en F5 y F9 (RTqPCR positiva a PRRSVNA); la posibilidad al introducir animales de origen externo con problemas reproductivos (altamente significativo) como se ve en F1 (9/20 PRRSV seropositivos, PRRSVav), F3 (RTqPCR EUPRRSVEU positiva), F5 (8/20 PRRSV seropositivos, NoPRRSVav) y F10 (14/20 seropositivos, NoPRRSVav); y por un calendario de vacunación mal aplicado para *Actinobacillus* y *Pasteurella* en F1, o necesario y no incluido en F2 (Cuadro 1).

No fue determinado el origen de las cepas de PRRSV detectadas por RTqPCR, pero algunas posibilidades podrían surgir de los registros de las granjas, por ejemplo la F9 (con la cerda PRRSVNA) utiliza semen de Tlaxcala, Hgo.; F1 (9/20 seropositivos, PRRSVav) introdujo 20 cerdas de reemplazo de Tlaxcala, que tuvieron problemas de fertilidad y repeticiones de celo y utiliza semen del estado de Sonora; F3 (anteriores de erradicación de PRRSV) trajo de Sonora la cerda diagnosticada con PRRSVEU.

La granja F7 con pocos seropositivos (15%; 3/20; NoPRRSVav) podría no tener una importante exposición a PRRSV, ya que de acuerdo a Brown et al⁽⁸⁾ el Idexx HerdChek PRRS 2XR enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) está basado en la proteína N codificada por ORF7, y con preocupación se han observado resultados positivos en granjas seronegativas.

(NAPRRSV RTqPCR positive), of external origin semen on some farms but mainly by its to high frequency use on F3 and F9 (NAPRRSV RTqPCR positive); the possibility of introducing external animals with reproductive problems (high significance) as happened in F1 (9/20 PRRSV sera positives, PRRSVhv), F3 (EUPRRSV RTqPCR positive), F5 (8/20 PRRSV sera positives, NoPRRSV hv) and F10 (14/20 sera positives, NoPRRSVav); and a bad vaccination scheduled for *Actinobacillus* and *Pasteurella* on F1, or necessary and not included on F2 (Table 1).

The origin of the PRRSV strains detected by RTqPCR was not determined, but some information derived from the farm records may give some hint about the infection origin, for example F9 (NA PRRSV sow) uses semen from Tlaxcala, Hgo. F1 (9/20 sera positives, PRRSVhv) introduced 20 replacement gilts from Tlaxcala which had fertility problems and estrus repetitions and uses semen brought from the State of Sonora, F3 (PRRSV eradication history) brought from Sonora, México, a sow diagnosed with EU PRRSV.

F7 with a low sera positivity (15 %; 3/20; NoPRRSVhv) might not have an important PRRSV exposition because according to Brown et al⁽⁸⁾ Idexx HerdChek PRRS 2XR enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) is based on protein N codified by ORF7 and there is a worry concern about some positive results on seronegative farms.

Differences on test detection type (RTqPCR for viral RNA on early infection stages mainly acute, ELISA for antibodies on more late stages), economical sample size possibilities for each test (RTqPCR is expensive limiting sample size), pigs age and productive stage (higher viral load possibilities on last third of pregnancy and on 9-16 wk old or less on piglets, early contact with placentas or intra litter; highest possibility of antibodies formation on 12-22 weeks old)⁽²¹⁾, carrier's low viral load with limited tissue distribution, low viremic pigs population by vaccination schedules, elimination policies of

Diferencias en el tipo de detección de cada prueba (RTqPCR para ARN viral en etapas tempranas de infección y más en aguda, ELISA para anticuerpos en etapas más tardías). En cuanto a posibilidades económicas de realización de cada prueba, RTqPCR es caro limitando el tamaño de muestra, edad y etapa productiva de los cerdos (más probabilidad de carga viral en gestantes en el último tercio y más en lechones de 9 a 16 semanas o menos, reciente contacto con placentas o intracamada; más posibilidad de formación de anticuerpos de 12 a 22 semanas)⁽²¹⁾, portadores con baja carga viral de distribución limitada de tejidos, disminución de animales virémicos por los calendarios de vacunación, políticas de eliminación de cerdas con repeticiones de celo y quizá una baja patogenicidad del virus circulante, podrían explicar las diferencias en resultados entre ambos métodos de diagnóstico utilizados (+/-), mencionándose poca concordancia entre las pruebas y suficiente sensibilidad para RTqPCR en muestras de sangre en trabajos similares^(16,21,29,30).

Para CRP, Done y White⁽²⁷⁾ consideran que a través de las décadas los signos y síntomas respiratorios han permanecido similares, pero las etiologías pueden diferir según cambios en el sistema productivo, el desarrollo de vacunas eficientes y la ocurrencia pasada y presente de nuevas enfermedades del sistema respiratorio. Esto podría explicar la baja frecuencia de problemas respiratorios en estas granjas gracias a sus instalaciones y medidas sanitarias de control y el aislamiento dominante de *Staphylococcus aureus* (patógeno posible)⁽³¹⁾ y *Streptococcus suis* en todas las granjas y sobre *Pasteurella* spp, y *Actinobacillus* spp, que si en un futuro se asilaran de problemas respiratorios o lesiones neumónicas, deberían realizarse estudios de patogenicidad como posibles etiologías bacterianas de CRP⁽³²⁾ y consecuentemente implicarse o no en calendarios de vacunación.

De acuerdo a lo observado en este estudio, mejorar el diagnóstico y control de PRRSV sería:

estrus repetition sows and maybe a low pathogenicity virus circulation explains differences in results between the diagnostic methods used (+/-). Additionally lack on concordance has been reported by others as well as enough sensibility of RTqPCR on blood samples^(16,21,29,30).

For PRDC, Done and White⁽²⁷⁾ consider that through decades respiratory signs and symptoms have remain similar but etiology may be different because of changes in production systems, efficient vaccines development and past and present occurrence of new severe respiratory system viral diseases. This may explain the low respiratory problems frequency in this farms, because of installations and sanitary management control, and the dominant isolation of *Staphylococcus aureus* (possible pathogen)⁽³¹⁾ and *Streptococcus suis* in all farms, and over *Pasteurella* spp, and *Actinobacillus* spp (interestingly present in PRRSVhv farms), which if in a future were isolated from respiratory problems or pneumonic lesions, it will be necessary to realize pathogenicity studies as possible PCR bacterial etiology⁽³²⁾ and consequently be implied or not in vaccination schedules.

According on what's observed on this study, to improve diagnosis and control of PRRSV will be: making a comparison with Duinhof *et al*⁽²¹⁾, a better PRRSV diagnosis per farm will require 12 individual blood samples with EDTA from 9-16 wk old pigs or younger for RTqPCR, and 12 blood samples without EDTA from 12-22 wk old pigs for ELISA. For economy and area coverage (more farms), on this study were 8 for RTqPCR and the same 12 for ELISA from age available at the moment on the production stage; for RTqPCR include blood, and even semen^(18,30), placenta or tonsil swab samples⁽²⁹⁾ of suspicious animals as could be a boar and its semen⁽³⁰⁾, semen straws, a bristle with fetal resorption or zeal repetition, even in the last quarter of pregnancy or a pool of four piglets blood, placenta or tonsil swabs samples⁽³⁰⁾ from a litter pen; viremic pigs

comparando con el estudio de Duinhof *et al.*(21), un mejor diagnóstico de PRRSV por granja, requeriría 12 muestras individuales de sangre con EDTA de cerdos de 9 a 16 semanas de edad o más jóvenes para RTqPCR, y 12 muestras de sangre sin EDTA, para suero, de cerdos de 12 a 22 semanas de edad para ELISA. En este estudio, por economía y ampliación de área (más granjas) fueron 8 para RTqPCR y las mismas 12 para ELISA, de las edades disponibles de las etapas productivas; para RTqPCR incluir muestras de sangre e incluso de semen(18), placenta o hisopado de tonsilas de animales sospechosos como sería un verraco y su semen(29) pajillas de semen, una cerda con reabsorción fetal o repetidora en el último cuarto de gestación, o un conglomerado de muestras de sangre, hisopado de tonsila o placenta de cuatro lechones de una misma camada; los cerdos virémicos detectados aislarlos o eliminarlos, procurando antes encaminar muestras de estos para obtener el PRRSV y su secuenciación; granjas NoPRRSVav, sin signos de brote, ELISA negativas-1/8-12 RTqPCR positivas o ELISA positivas-RTqPCR negativas, probar evitar el riesgo de introducir virus vacunal e iniciar un programa de control de vacunación con virus inactivado; en toda granja comprar animales y semen certificados libres de PRRSV o hacer pruebas rutinarias de RTqPCR y ELISA antes de introducirlos; ubicar o reubicar las granjas en áreas rurales o semi rurales; revisar e implementar condiciones de instalaciones, manejo general en la granja y medidas estratégicas de prevención(30) como para densidad, temperatura y ventilación adecuados, reducir o evitar mezcla de camadas, sanidad general, de agua y alimento, calendarios de vacunación necesarios; usar ultrasonido para detectar reabsorciones fetales; mayor atención en los registros para abortos, repeticiones de celo, reabsorciones fetales, mortalidad de lechones, mortalidad de recién nacidos y retrasos en el crecimiento y en su pronta relación con los registros de la cerda, recursos de semen y la progenie derivada, para poder tomar medidas de control temprano.

detected should be isolated and or eliminated and samples to search for PRRSV and sequencing should be taken; farms NoPRRSVav, with no PRRSV outbreak signs, ELISA negatives-1/8-12 RTqPCR positives or ELISA positives-RTqPCR negatives try to avoid vaccine virus introduction risk starting a vaccination schedule with inactivated virus vaccination; in all farm buy pigs and semen from PRRSV free certified origin or do RTqPCR and ELISA routine test before introduce them; farms in urban or semi urban areas may be relocated on rural or semirural areas; review and improvement of installations, general management and medical prevention strategies should be implemented(27) as to suitable temperature, ventilation and animal density, reduce or avoid piglet litter mixing, ensure general sanity and sanity of water and food, vaccination schedules needed, and use of ultrasound to detect embryo resorptions. Attention must be paid on sow abortions, estrus repetition, embryo resorptions, piglet's mortality and stunting, and relationships with sow history, semen resource, and progeny derived from it, to take early control measures.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was realized and published thanks to the authorization of "Comite de Fomento y Protección Pecuaria del Estado de Mexico" (CFPPEM) under a service from CFPPEM and Universidad Autonoma del Estado de México (UAEMéx) financed by Grupo Produce in México State; we thanks the advices, confidence and cooperation provided by professionals and persons in general from the farms involved.

End of english version

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue realizada y publicada gracias a la autorización del "Comité de Fomento

y Protección Pecuaria del Estado de México” (CFPPM) bajo un servicio de CFPPM y la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMéx) financiado por Grupo Produce en el estado de México. Agradecemos las observaciones, confianza y cooperación otorgada por profesionistas y personas en general, de las granjas involucradas.

LITERATURA CITADA

- Arias M, Barceló J, Muñoz A, Sánchez-Vizcaino JM. Síndrome Respiratorio Reproductivo Porcino. Sánchez-Vizcaino JM editor. Curso digital de enfermedades infecciosas porcinas [en línea]. <http://www.sanidadanimal.info/cursos/curso/9/9-prrs.htm>. Consultado Nov 15, 2011.
- Morrilla A, González-Vega D, Diosdado F, Estrada E. Seroepidemiology of PRRS in México. 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases. Rome. 2003.
- Cruz MC, Mogollón JD, Rincón MA, Peña NB, Ruiz S, Lora AM. Prevalencia serológica del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) en cerdos de explotaciones extensivas de Colombia. *Rev Med Vet Zoot* 2006;53:33-41.
- Benfield D A, Collins JE, Dee SA, Halbur PG, Joo HS, Lager KM, *et al.* Porcine reproductive and respiratory syndrome. In: Straw B, D’Allaire S, Mengeling WL, Taylor DJ, editors. *Diseases of swine*. 8th ed. Ames (Iowa), Iowa State University Press; 1999:201-232.
- Callen A. La problemática del control del PRRS en granjas de reproducción. 2006. [en línea]. http://www.porcicultura.com/porcicultura/home/articulos_int.asp?cve_art=388. Consultado Nov 15, 2011.
- Kleiboeker SB, Schommer SK, Lee S-M, Watkins S, Chittick W, Polson D. Simultaneous detection of North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome virus using real-time quantitative reverse transcriptase-PCR. *Brief communications. J Vet Diag Invest* 2005;17:165-170.
- Flores-Mendoza L, Hernández J. Vacunas contra el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV): escribiendo una historia. *Vet Méx* 2010;41:139-159.
- Brown E, Lawson S, Welbon C, Gnanandarajah J, Li J, Murtaugh MP, *et al.* Antibody response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) Nonstructural proteins and implications for diagnostic detection and differentiation of PRRSV Types I and II. *Clin Vaccine Immunol* 2009;16:628-635.
- Zhou Z, Nia J, Cao Z, Hana X, Xia Y, Zia Z, *et al.* The epidemic status and genetic diversity of 14 highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus (HP-PRRSV) isolates from China in 2009. *Vet Microbiol* 2011; 150:257-269.
- Shi M, Lam TT-Y, Hon Ch-Ch, Murtaugh MP, Davies PR, Hui RK-H, *et al.* Phylogeny-based evolutionary, demographical, and geographical dissection of north american type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *J Virol* 2010;84:8700-8711.
- Goldberg TL, Lowe JF, Milburne SM, Firkins LD. Quasispecies variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus during natural infection. *J Virol* 2003;317:197-213.
- Thanawongnuwecha R, Suradhatb S. Progress in porcine respiratory and reproductive syndrome virus biology and control. *Virus Res* 2010;154(1-2):133-140.
- Flores-Mendoza L, Silva-Campa E, Reséndiz M, Osorio FA, Hernández J. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infects mature porcine dendritic cells and up-regulates interleukin-10 production. *Clin Vaccine Immunol* 2008;15:720-725.
- Sierra N, Ramírez R, Mota D. Aislamiento del virus de PRRS en México: Estudio clínico, serológico y virológico. *Arch Med* 2000;32(1):1-9.
- Xiao S, Jia J, Mo D, Wang Q, Qin L, He Z, *et al.* Understanding PRRSV infection in porcine lung based on genome-wide transcriptome response identified by deep sequencing. *PLoS One* 2010;5(6): e11377.
- 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 el sureste de México. *Revista Científica* 2010;2(1):17-23.
- Hansen MS, Pors SE, Jensen HE, Bille-Hansen V, Bisgaard M, Flachs EM, *et al.* An investigation of the pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease complex in Denmark. *J Comp Path* 2010;143:120-131.
- Jordán-Cravioto A, Segura-Correa JC, Alzina-López A, Rodríguez-Buenfill JC, Villegas-Pérez S. Prevalence and risk factors associated with the PRRS virus in semen of boars in pig farms of Yucatan. *Trop Subtrop Agroecosys* 2010;12(1):1-6.
- Segura JC, Honhold N. Muestreo en múltiples etapas. En: *Métodos de muestreo para la producción y la salud animal*. Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán. México. 2000.
- Martin SW, Meek AH, Willeberg P. *Veterinary epidemiology, principles, and methods*. Ames, Iowa, USA: Iowa State University Press; 1987.
- Duinhof T F, van Schaik G, van Esch EJB, Wellenberg GJ. Detection of PRRSV circulation in herds without clinical signs of PRRS: Comparison of five age groups to assess the preferred age group and sample size. *Vet Microbiol* 2011;150:180-184.
- Wellenberg GJ. Review: diagnostic methods for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infections. *Tijdschr. Diergeneeskde* 2006;131(16):566-572.
- van Maanen C, von Banniseht-Wysmuller TE, van Esch EJB, Wellenberg GJ. Comparison and validation of selected conventional and real-time PCR methods for the detection and differentiation of European and American-type PRRSV in field samples. *Proc ESVV Congress Lisbon, 2006*.
- Gerstman BB. 17: Case-control studies (odds ratios). C:/date/StatPrimer/case-control.doc [on line]. <http://www.sjsu.edu/faculty/gerstman/StatPrimer/case-control.pdf>. De StatPrimer (Version 6.4): <http://www.sjsu.edu/faculty/gerstman/StatPrimer/>. Accessed Nov 15, 2011.

25. EPIDAT programa para análisis epidemiológico de datos tabulados (programa para computadora) versión 3.1. Dirección Xeneral de Saúde Pública, Cosellería de Sanidade-Xunta de Galicia, Área de Análisis de Salud y Sistemas de Información Sanitaria Organización Panamericana de la Salud (OPS/OMS), 2006.
26. Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, Fitz Patrick ES, Fanning S, Hartigan PJ. *Veterinary microbiology and microbial disease*. 2nd ed. Ames: Wiley-Blackwell; 2011.
27. Done S, White M. Porcine respiratory disease and complexes: the story to date. In *Practice* 2003;25:410-417.
28. Batista L, Murtaugh M, Pijoan C. Variación genética de PRRSV. *Anaporc* 2003;23(236):52-60.
29. Rovira A, Clement T, Christopher-Hennings J, Thompson B, Engle M, Reicks D, *et al.* Evaluation of the sensitivity of reverse-transcription polymerase chain reaction to detect porcine reproductive and respiratory syndrome virus on individual and pooled samples from boars. *J Vet Diagn Invest* 2007;19:502-509.
30. Wasilk A, Callahan JD, Christopher-Hennings J, Gay TA, Fang Y, Dammen M, *et al.* Detection of U.S. Lelystad, and European-Like porcine reproductive and respiratory syndrome viruses and relative quantization in boar semen and serum samples by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2004;42(10):4453-4461.
31. Atanasova K, van Gucht S, Barbé F, Duchateau L, van Reeth K. Lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* exacerbates respiratory disease in porcine respiratory coronavirus-infected pigs. *Vet J* 2011;88(2):210-215.
32. Palzer A, Ritzmann M, Majzoub M, Wolf G, Hermanns W, Heinritzi K. Frequency of occurrence of pneumonia associated agents and their correlation with clinical and pathological-anatomical findings in pigs. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2007;120(11-12):483-489.