



**UADY**

POSGRADO  
INSTITUCIONAL  
EN CIENCIAS  
AGROPECUARIAS Y  
MANEJO DE RECURSOS  
NATURALES TROPICALES

**DETECCIÓN DEL VIRUS DE PRRS EN LA MOSCA  
DOMÉSTICA (*Musca domestica*) DE UNA GRANJA  
PORCINA DE YUCATÁN, MÉXICO.**

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO  
DE

MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

POR

**Médico Veterinario Zootecnista**

**Gladys Isabela Noh Cuxim**



POSGRADO INSTITUCIONAL  
CIENCIAS AGROPECUARIAS Y MANEJO  
DE RECURSOS NATURALES TROPICALES

**Asesores:**

**Dr. José Alberto Rosado Aguilar**

**MSc Alejandro Alzina López**

**Jeffrey James Zimmerman DVM, MSc, PhD**

Mérida, Yuc., México, Septiembre de 2018



**UADY**  
UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA  
DE YUCATÁN

**COORDINACIÓN GENERAL  
DEL SISTEMA DE POSGRADO,  
INVESTIGACIÓN Y VINCULACIÓN**

POSGRADO INSTITUCIONAL EN CIENCIAS  
AGROPECUARIAS Y MANEJO DE RECURSOS  
NATURALES TROPICALES

**ALUMNA: MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA  
GLADYS ISABELA NOH CUXIM**

**SÍNODO DEL EXAMEN DE TESIS DE GRADO**

**DRA. GUADALUPE AYORA TALAVERA  
CIR-HIDEYO NOGUCHI**

**DR. EDWIN GUTIÉRREZ RUIZ  
CCBA-UADY**

**DR. PABLO MANRIQUE SAIDE  
CCBA-UADY**

**DR. EDUARDO GUTIÉRREZ BLANCO  
CCBA-UADY**

**DR. CARLOS ACEVEDO ARCIQUE  
CCBA-UADY**

**DR. ARMANDO AGUILAR CABALLERO  
CCBA-UADY**

**MÉRIDA, YUCATÁN, SEPTIEMBRE DEL 2018**

## **Declaratoria de originalidad**

El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado alguno. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la FMVZ-UADY para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente.

## **Agradecimientos**

Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada, a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ-UADY) y al Centro de Investigaciones Regionales (CIR) “Dr. Hideyo Noguchi” por su apoyo para la realización de este trabajo de investigación.

A mi asesor de tesis el MSc. Alejandro Alzina López, por confiarme este proyecto, por todo su apoyo, dedicación y por todas sus enseñanzas durante mi formación académica, consejos e infinita paciencia durante tanto tiempo, por su gran inteligencia y por toda la confianza otorgada.

A la PhD. Guadalupe Ayora Talavera, por su colaboración y apoyo, durante mi estancia en el laboratorio de virología para la realización del trabajo, así como a los compañeros del laboratorio por sus atenciones.

A la QFA. Sandra Villegas Pérez, por su valiosa colaboración durante todo el proyecto.

A mi comité tutorial a la PhD. Guadalupe Ayora Talavera, al PhD. Edwin Gutierrez, y al PhD. Pablo Manrique Saide, por todo su apoyo y seguimiento en el presente trabajo.

A la granja “Mi Rancho” por permitirme trabajar en sus instalaciones y al personal por su ayuda.

A mi madre por todo el apoyo durante mi toda mi formación académica.

## Dedicatoria

A **Dios** por todas las bendiciones recibidas y por todo lo que aún esta por llegar.

A mi madre **Maria Nidelvia Noh Cuxim** por acompañarme siempre y por su incondicional apoyo en todo lo que me he propuesto y por su invaluable amor.

A mi abuela **Rufina Pat** y hermanos **Luis y Alejandro**, con mucho cariño.

Al **MSc. Alejandro Alzina López**, por brindarme su amistad y darme la oportunidad de trabajar con él y compartirme todos sus conocimientos.

A mis amigos: **Omar Castillo, Gabriela Flota, Monserrat Cob, Ivette Velázquez, William Novelo, José Ortíz, Eduardo Aválos, Eduardo Ramos**; por acompañarnos y hacer ameno este camino.

A **Heyder Carrillo** por su apoyo y por acompañarme en esta etapa tan importante en mi vida.

## RESUMEN

El objetivo del estudio fue detectar la presencia del virus de PRRS en la mosca doméstica, (*Musca domestica*) utilizando una población de cerdos alojados en una misma nave, en condiciones de campo. Se analizaron un total de 1277 datos de muestreos serológicos con la prueba de ELISA (IDEXX HerdChek® X3 PRRS), con el fin de saber si había circulación del virus de PRRS. Adicionalmente se tomaron 26 muestras de fluidos orales de cerdos alojados en corrales y se colectaron 300 moscas domésticas, formando 50 homogenizados de 6 moscas cada uno, para la detección del ácido nucleico del virus del PRRS. Tanto los fluidos orales como los homogenizados se procesaron mediante la prueba de RT-PCR en tiempo real. El 95.74% (1224/1277) de los sueros resultaron positivos a la prueba de ELISA. El ácido nucleico del virus de PRRS, fue detectado en el 30.7% (8/26) de los fluidos y en el 2% (1/50) de los homogenizados de mosca doméstica analizados. Con base a los resultados obtenidos, el virus de PRRS se encuentra presente en la mosca doméstica, sin embargo es importante mencionar que se requieren más estudios como la secuenciación para confirmar esta hipótesis. Se sugieren realizar más estudios.

**Palabras clave:** Mosca doméstica, vPRRS, RT-PCR, Porcinos

## ÍNDICE

1	<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>9</b>
2	<b>2. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	<b>11</b>
3	<b>2.1 Historia</b> .....	11
4	<b>2.2 Prevalencia</b> .....	11
5	<b>2.3 Mortalidad y morbilidad</b> .....	12
6	<b>2.4 Etiología y sobrevivencia</b> .....	12
7	<b>2.5 Variabilidad genética</b> .....	12
8	<b>2.6 Diagnóstico</b> .....	14
9	<b>2.6.1 Serología</b> .....	15
10	<b>2.6.2 Pruebas Moleculares</b> .....	15
11	<b>2.7 Patogenia</b> .....	16
12	<b>2.8 Signos clínicos y clasificación de hatos por infección al virus de PRRS</b>	
13	.....	17
14	<b>2.9 Mecanismos de transmisión</b> .....	18
15	<b>2.10 Dípteros: vectores de agentes patógenos</b> .....	18
16	<b>2.11 Moscas: vectores mecánicos del vPRRS.</b> .....	19
17	<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	<b>21</b>
18	<b>4. OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>21</b>
19	<b>4.1 Objetivos específicos</b> .....	21
20	<b>5. REFERENCIAS</b> .....	<b>22</b>
21	<b>6. ARTÍCULO</b> .....	<b>28</b>
22	<b>6.1 ABSTRACT</b> .....	29
23	<b>6.2 INTRODUCCIÓN</b> .....	30
24	<b>6.3 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	33
25	<b>6.3.1 Área de estudio</b> .....	33
26	<b>6.3.2 Granja de estudio</b> .....	33
27	<b>6.3.3 Diseño experimental</b> .....	34
28	<b>6.3.4 Confirmación de la circulación del virus de PRRS</b> .....	34
29	<b>6.3.6 Obtención de mosca doméstica</b> .....	34
30	<b>6.3.7 Extracción de ARN viral</b> .....	35
31	<b>6.3.8 Análisis de Fluido Oral y homogenizados de mosca doméstica por</b>	
32	<b>RT-PCR en tiempo real.</b> .....	35

33	<b>6.4 RESULTADOS</b> .....	37
34	<b>6.5 DISCUSIÓN</b> .....	38
35	<b>6.6 CONCLUSIÓN</b> .....	41
36	<b>6.7 REFERENCIAS</b> .....	42
37	<b>6.8 ANEXO</b> .....	49

## 1. INTRODUCCIÓN

En México, la industria de carne de cerdo en 2016 fue de 1, 754, 231 toneladas, representando un ingreso anual de \$ 44, 571, 600 pesos. Yucatán aportó el 9.8% de esa producción (SAGARPA-SIAP, 2016). Sin embargo existen enfermedades emergentes y re-emergentes que afectan esta industria, causadas por agentes virales, que ejercen un impacto negativo en la productividad y economía de los sistemas de producción (Thanapongtharm *et al.*, 2014).

En granjas de Yucatán, se han detectado los virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (vPRRS, por su siglas en inglés), circovirus porcino tipo 2 (PCV2), influenza y parvovirus porcino. La enfermedad del virus de PRRS es la responsable de las mayores pérdidas económicas en la industria porcina (Neumann *et al.*, 2005). En Estados Unidos en el 2011, se estimó una pérdida anual de alrededor de \$664 millones de dólares (Holtkamp *et al.*, 2013).

Cuando el virus de PRRS está activo, afecta los parámetros productivos, habiendo una disminución de la fertilidad, ausencia o retraso en el retorno al estro (Collins *et al.*, 1992). El virus es altamente infeccioso, ya que con 10 partículas virales, es capaz de establecer una infección cuando se expone por vía intranasal, sin embargo, es difícil de transmitirse a otros cerdos, a menos que estén en contacto muy estrecho, es decir, la enfermedad es poco contagiosa (Morrow y Roberts, 2001).

Los sistemas intensivos actuales han logrado incrementar significativamente la producción en los últimos años, sin embargo una alta concentración de cerdos es considerado el principal factor de riesgo, al permitir una mayor transmisión de enfermedades (Davies, 2011). En la zona sur de Yucatán, en un área de aproximadamente 10 km, se han establecido grandes granjas, representando el 40% (31, 000 vientres) del pie de cría. Además se han establecido algunas granjas de destete (SAGARPA, 2016).

La diseminación de la enfermedad puede darse entre los animales de la granja, debido a la densidad de población, mediante el contacto directo o por secreciones contaminadas (Cho y Dee, 2006), y vectores mecánicos como los dípteros (Otake *et al.*, 2003). En un estudio de campo realizado por Pitkin *et al.*, (2009), se confirmó mediante la técnica de PCR, la presencia del vPRRS en moscas (*Musca domestica*), concluyendo que las moscas, pueden representar un factor de riesgo para el transporte y la transmisión del vPRRS entre las poblaciones de cerdos. Sin embargo, a la fecha no hay estudios en Yucatán, sobre el papel que juega la mosca doméstica como vector mecánico en la transmisión de enfermedades hacia los porcinos.

## **2. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1 Historia**

La enfermedad del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS), antes reconocido como la enfermedad misteriosa del cerdo o enfermedad de la oreja azul (Muirhead y Alexander, 1997), se encuentra distribuida en la mayor parte del mundo donde existe producción de cerdos (Barroso *et al.*, 2002).

En los Estados Unidos, fue reconocida en 1987 (Weimersheimer-Rubí *et al.*, 1997). En México, la enfermedad fue clínicamente descrita por primera vez en 1992 (López-Heydeck *et al.*, 2013). Esta produce pérdidas económicas importantes, solo en Estados Unidos en el 2011, se estimó una pérdida anual de alrededor de \$664 millones de dólares (Holtkamp *et al.*, 2013).

### **2.2 Prevalencia**

En un estudio realizado en México, se estimó una seroprevalencia a vPRRS de 18.1% en cerdos de 31 granjas (Correa-Giron *et al.*, 1994).

En Yucatán, el vPRRS es endémico y se ha reportado una seroprevalencia entre granjas igual o mayor a 30%. Como un factor de riesgo se determinó que las granjas que utilizaban vientres para remplazo de origen externo, tenían 6.70 veces más probabilidad de tener una prevalencia igual o mayor a 30% en comparación con las que utilizaban autoreemplazos (Barroso *et al.*, 2002).

Otros estudios reportan seroprevalencias de 39.4% en sementales (Rovelo-Celorio *et al.*, 2010) y una prevalencia de 10.1% en semen de verracos (Jordán-Craviotto, *et al.*, 2010).

Un estudio de vigilancia epidemiológica realizada por SENASICA en 2014, reportó una seroprevalencia de 28.13% al vPRRS en sementales, y en 2015 una seroprevalencia entre granjas del 53.30%.

### **2.3 Mortalidad y morbilidad**

Las tasas de mortalidad por PRRS en las granjas oscilan entre 6.02% y 91.28% según la etapas de producción. En estudios controlados, en donde los animales se inocularon con virus de PRRS a los, 70 días de edad se obtuvo una morbilidad y mortalidad de 100% y 60%, respectivamente (Ni *et al.*, 2012).

### **2.4 Etiología y sobrevivencia**

El vPRRS es un virus RNA envuelto de una sola cadena en sentido positivo (Cho y Dee, 2006), tiene forma esférica de aproximadamente 50 a 65 nm de diámetro (Goldberg *et al.*, 2003). Corresponde al orden de los *Nidovirales*, de la familia *Arteriviridae*, del género *Arterivirus* (Cho y Dee, 2006). Debido a su envoltura, la viabilidad del virus fuera del huésped se ve afectada por condiciones ambientales, siendo estable entre 4 y -70°C. Sin embargo, es sensible a temperaturas y pH entre 37-56°C (Benfield *et al.*, 1992) y <6.0 o >7.65, respectivamente. Además, la exposición del virus a los detergentes reduce su infectividad (Cho y Dee, 2006).

### **2.5 Variabilidad genética**

Estudios han demostrado que el vPRRS puede mutar rápidamente (Goldberg *et al.*, 2003). El genoma de vPRRS está compuesto por 9 marcos de lectura abiertos (ORF, siglas en inglés). Presenta en el extremo 5' una región corta no traducible (UTR, siglas en inglés) seguida de los denominados ORF1a, ORF1b, ORF2a, ORF2b, ORF3, ORF4, ORF5, ORF6 y ORF7. La ORF1a y ORF1b constituyen aproximadamente el 75 % del tamaño del genoma y codifican a la polimerasa (López- Heydeck *et al.*, 2015). Las ORF 5 y ORF 7 codifican la mayoría de las proteínas estructurales del virus, particularmente la ORF 7 que codifica la proteína de la nucleocápside (N) (Figura 1) (López- Heydeck *et al.*, 2015).

La ORF 7 tiene 372 pares de bases y presenta 123 aminoácidos; se considera la proteína más inmunogénica y por lo tanto la ideal para pruebas serológicas para detectar cerdos infectados. Así mismo permite una detección de variantes más amplia que el ORF 5, debido a que es el más conservado y por lo tanto se emplea en los test diagnósticos basados en RT-PCR. (Kukielka y Sánchez-Vizcaíno 2008; López-Heydeck *et al.*, 2015). La ORF 5 presenta 200 aminoácidos, codifica la proteína de la envoltura (GP5), exhibe una variación genética muy marcada dentro de su secuencia de 600 pares de bases, por lo que comúnmente es utilizado para la identificación de variantes del virus mediante la secuenciación y construcción de árboles filogenéticos (Opriessnig *et al.*, 2005; López- Heydeck *et al.*, 2015).

Debido a las diferencias en la secuencia de sus nucleótidos, se han clasificado en dos genotipos, el tipo Europeo o tipo 1 (PRRSV-1), constituido por la cepa Lelystad y el genotipo Americano o tipo 2 (PRRSV-2), cuyo prototipo es el aislado ATCC-VR-2332. Ambos genotipos comparten aproximadamente 63.4% de identidad a nivel genómico (Wensvoort *et al.*, 1991; Collins *et al.*, 1992; Allende *et al.*, 1999). Estudios genéticos basados en los análisis de la secuencia del ORF5 y ORF7 señalan la división del tipo 1 en cuatro subtipos genéticos bien diferenciados: el subtipo 1 o Pan-europeo, y los subtipos 2, 3 y 4 de Europa del Este (Stadejek *et al.*, 2006).

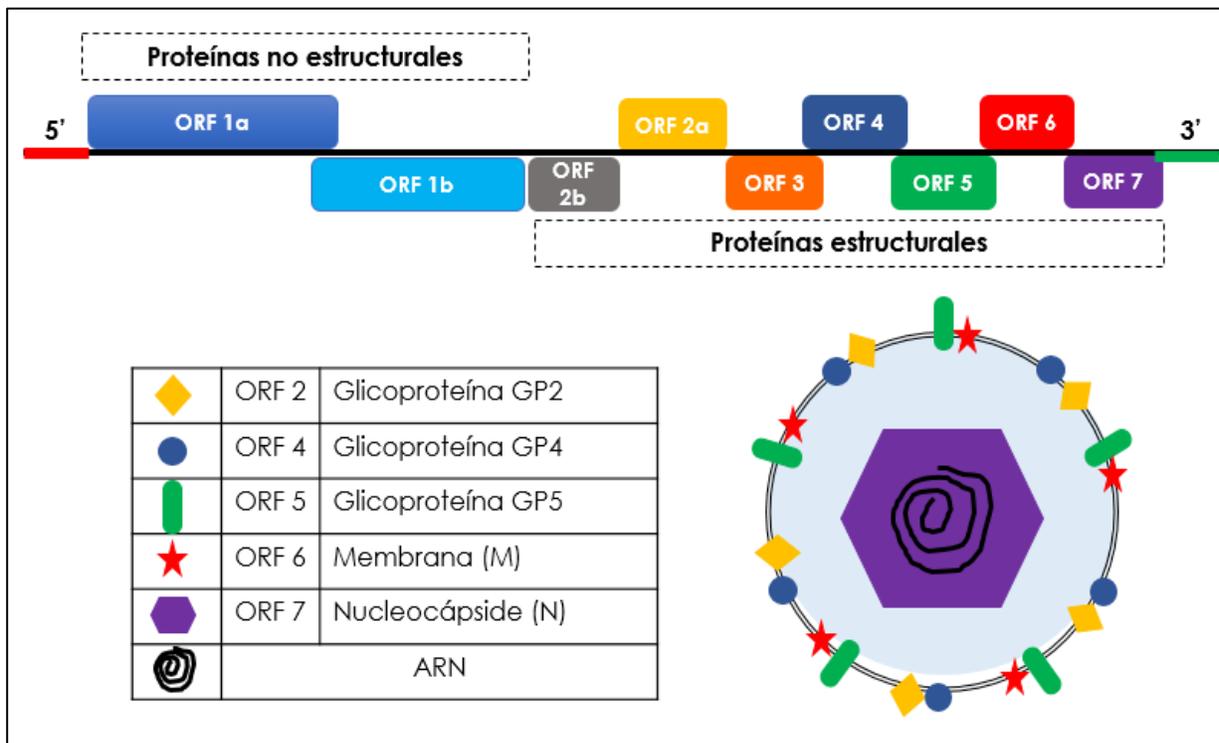


Figura 1. Esquema del genoma del virus de PRRS. Compuesto de una molécula policistrónica de ARN de sentido positivo y por 9 marcos de lectura abiertos (ORFs) que codifican las diferentes proteínas funcionales y estructurales. El ORF1a y ORF1b constituyen aproximadamente el 75 % del tamaño del genoma y codifican a la polimerasa (modificado de Díaz, 2006).

## 2.6 Diagnóstico

Para el diagnóstico del virus de PRRS, los signos clínicos no son suficientes, es necesario confirmar con pruebas de laboratorio. Entre las pruebas diagnósticas comúnmente utilizadas para la detección de anticuerpos, está la prueba de Ensayo de Inmunoabsorbancia Ligado a Enzimas (ELISA) (Okinaga *et al.*, 2009) y pruebas moleculares como reacción en cadena de la polimerasa con reversa transcriptasa (RT-PCR, por sus siglas en inglés) (Toplak *et al.*, 2012; Gerber *et al.*, 2013).

### **2.6.1 Serología**

La prueba de ELISA, es utilizada para el monitoreo de poblaciones de animales. En el mercado existen kits comerciales; ELISA (IDEXX HerdChek® X3 PRRS), detecta anticuerpos del virus de PRRS, de la cepa americana en fluidos orales y en suero. El punto de corte que se utiliza en esta prueba es el valor s/p (sample to positive proportion o proporción de muestra positiva)  $\geq 0.4$ , para considerar la muestra positiva. Posee una sensibilidad y especificidad de 98.8% y 99.9% respectivamente en suero y una sensibilidad y especificidad de 100 y 98.7% en fluidos orales (FO) (Sattler *et al.*, 2015; De Regge y Cay, 2016)

### **2.6.2 Pruebas Moleculares**

#### **2.6.2.1 Reacción en cadena de la polimerasa reversa transcriptasa (RT-PCR)**

El método de RT-PCR, es una de las técnicas más comúnmente usadas para la detección y amplificación del ARN del vPRRS, es un método muy sensible (Gerber *et al.*, 2013) eficiente, rápido y reproducible para medir la expresión génica.

Permite la detección del virus en suero de animales infectados a partir del tercer día postinfección (Sattler *et al.*, 2015), su capacidad de detección es de tres partículas virales por reacción de PCR (Prieto *et al.*, 1996). La sensibilidad de esta prueba es 99% y su especificidad es 99% (Wasilk *et al.*, 2004).

#### **2.6.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa reversa transcriptasa (RT-PCR) en tiempo Real**

La prueba de RT-PCR en tiempo real, es considerada la prueba de oro estándar para la medición de la expresión génica, debido a su alta especificidad y sensibilidad (Arikawa *et al.*, 2008).

Esta prueba se utiliza para cuantificar los niveles de mRNA de muestras muy pequeñas (Vishnukumar *et al.*, 2013). Se basa en la detección de una señal fluorescente producida proporcionalmente durante la amplificación de un producto de PCR. Se diseña una sonda para unirse con la secuencia diana entre los cebadores tradicionales forward y reverse (Grove, 1999; Foy y Parkes 2001).

La cuantificación del ADN se basa en la determinación del valor del ciclo límite (Ct) en el que aparece la emisión del fluorocromo. La cantidad de fluorescencia liberada durante el ciclo de amplificación es proporcional a la cantidad de producto generado en cada ciclo (Grove, 1999; Yang *et al.*, 2006). Cuanto mayor sea el número de copias de ADN, más pronto se detectará la amplificación del producto (Yang *et al.*, 2006).

La fluoresceína es dada por diversos colorantes fluorescentes, sondas y/o cebadores marcados; tal es el caso de las sondas TaqMan o sondas de hidrólisis, las cuales se basan usando un fluorocromo para monitorear la amplificación de genes diana por la ADN polimerasa. Esta emplea una sonda de hibridación fluorogénica, con dos marcadores específicos de un objetivo, con un apagador (quencher) en el extremo 3' para ser hidrolizada por la actividad de la exonucleasa 5' a 3' de la Taq polimerasa durante la etapa de extensión (Arikawa *et al.*, 2008; Nagy *et al.*, 2017)

Entre los colorantes fluorescentes de uso común, se encuentra el SYBR Green, que une moléculas de ADN de doble cadena por intercalación entre las bases de ADN. Se utiliza en RT-PCR en tiempo real, ya que la fluorescencia se puede medir al final de cada ciclo de amplificación para determinar cuánto ADN ha sido amplificado (Arikawa *et al.*, 2008).

## **2.7 Patogenia**

El virus de PRRS es altamente infeccioso, con 10 partículas es capaz de establecer una infección cuando se expone por vía intranasal, por otro lado, es difícil de infectar

a otros cerdos, excepto si estos se encuentran en un contacto muy estrecho, es decir, la enfermedad no es muy contagiosa (Morrow y Roberts, 2001).

Un estudio controlado donde 37 cerdos destetados fueron inoculados con vPRRS, se presentó un tiempo de respuestas febril de 3 a 10 días post-inoculación (Che *et al.*, 2012). Las tonsilas, pulmones y órganos linfoides, permiten su replicación de manera persistente (Lamontagne *et al.*, 2003).

Las cerdas jóvenes suelen ser muy susceptibles al vPRRS, se vuelven virémicas durante aproximadamente 2 semanas, el virus puede atravesar la placenta para infectar a los fetos, quienes desarrollan una viremia prolongada dando como resultado una mala viabilidad y la muerte. Los lechones nacidos débiles permanecen virémicos durante 3 semanas o más (Van-Alstine *et al.*, 1993). La viremia en los verracos es de corta duración, existe la posibilidad de que permanezcan seropositivos durante mucho tiempo, aunque no están eliminando el vPRRS a través del semen (Jordán-Craviotto *et al.*, 2010). El virus puede difundirse de los tejidos linfoides regionales hasta nivel sistémico.

## **2.8 Signos clínicos y clasificación de hatos por infección al virus de PRRS**

Cuando el vPRRS ingresa por primera vez a una granja negativa provoca abortos, disminución de la fertilidad y retraso en el retorno al estro (Collins, *et al.*, 1992) de manera dramática. Actualmente, en las granjas, los signos clínicos no se observan de esa manera. Con base a eso se ha hecho una clasificación de hatos en cuatro categorías (Holtkamp *et al.*, 2011):

*Positivo activo inestable* (I): cuando hay signología clínica, eliminación viral, seropositividad y se ven afectados negativamente los indicadores de producción.

*Positivo activo estable* (II): Seropositividad en el pie de cría, destete y engorda, no hay signología clínica.

*Negativo Provisional (III)*: comienza 60 días después del ingreso de reemplazos negativos al lote de producción y se deben realizar pruebas para confirmar que se mantienen como no infectadas. Las pruebas de ELISA a los reemplazos, deben ser negativos.

*Negativo (IV)*: no presentan anticuerpos.

## **2.9 Mecanismos de transmisión**

Cuando el virus se presenta por primera vez dentro de una granja porcina, se difunde rápidamente (Jordán-Craviotto *et al.*, 2010). La transmisión puede darse entre los cerdos, debido a la densidad de población mediante el contacto directo o por secreciones contaminadas, como el semen, sangre y saliva (Cho y Dee, 2006), agujas, fómites (overoles y botas) y vectores mecánicos como los dípteros (Otake *et al.*, 2003). La época de lluvias, la humedad y altas temperaturas favorecen el incremento de los dípteros en las granjas, afectando la salud y bienestar de los animales (Schurrer *et al.*, 2005).

## **2.10 Dípteros: vectores de agentes patógenos**

Las moscas son insectos que pertenecen al orden Díptera, considerados agentes potenciales en la transmisión de enfermedades (Fasanella *et al.*, 2010). Son comunes en las granjas porcinas, donde se desarrollan y se alimentan de los residuos de animales y es donde estos dípteros pueden adquirir bacterias, virus o parásitos a través de sus partes bucales (al ingerir líquidos de tejidos animales, incluyendo sangre, suero, saliva, moco y secreciones lacrimales), los pelos de su cuerpo y patas. Estos insectos al defecar y regurgitar (Schurrer *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2011) pueden infectar a animales y seres humanos con los agentes adquiridos (Hung *et al.*, 2015). Estudios previos ha demostrado que las moscas actúan como

vectores para transmisión de patógenos (Murvosh y Thaggard, 1996), así como el vPRRS (Otake *et al.*, 2003).

### **2.11 Moscas: vectores mecánicos del vPRRS.**

En los Estados Unidos, se han realizado diferentes estudios en la mosca doméstica (*Musca domestica*), como vectores mecánicos del vPRRS.

Otake *et al.*, (2003), en la “supervivencia del virus del vPRRS en la mosca doméstica”, analizaron muestras con la prueba de RT-PCR (TaqMan® RT-PCR), e indicaron que el vPRRS, puede sobrevivir en el tracto intestinal de las moscas domésticas hasta por 12 horas después de alimentarse de un cerdo infectado, pero sólo por un corto período en la superficie externa de las moscas. Schurrer *et al.*, (2004) estudiaron la dispersión espacial del vPRRS hasta por  $\geq 1.7$  kilómetros, utilizando *M. domestica* que estuvieron en contacto con cerdos infectados experimentalmente con el vPRRS. Por su parte Dee *et al.*, (2004), trabajaron en la transmisión del vPRRS en condiciones de campo, detectando un aumento en la transmisión del vPRRS conforme las condiciones climáticas favorecían al aumento de la mosca doméstica.

Schurrer *et al.*, (2005) evaluaron, las muestras de intestinos de *M. domestica*, mediante la prueba de RT-PCR e indicaron que la retención del virus en la mosca doméstica, parece estar en función de la carga viral inicial, después de la ingestión y la temperatura ambiental. Estos factores pueden afectar el riesgo de propagación del virus.

Finalmente en 2009, Pitkin *et al.*, realizaron una nueva evaluación de la *M. domestica* como transmisor del vPRRS en condiciones de campo. Demostraron que la mosca representa un riesgo para el transporte y la transmisión del vPRRS entre las poblaciones de cerdos en condiciones de campo, ya que recuperaron moscas liberadas en su experimento en otro sitio que albergaba animales negativos al vPRRS.

## 2.12 Trampas para colecta de dípteros

Existen diversas trampas para la captura de insectos (Delfín *et al.*, 2011), sin embargo la elección del método a utilizar dependerá del tipo de muestreo que se desee realizar o el tipo de insectos que se pretenda colectar (Ramírez *et al.*, 2014). Los métodos más comunes para el muestreo de insectos, se pueden clasificar en directos e indirectos (Delfín *et al.*, 2011). Dentro de los métodos directos se encuentra el uso de red entomológica a través del muestreo en transectos lineales o directamente en plantas en floración, así como el uso de aspiradores. Entre los muestreos indirectos están la trampa Malaise, platos trampa, trampas de cebo, uso de atrayentes, trampas pegajosas etc. (Delfín *et al.*, 2011, Ramírez *et al.*, 2014).

### **3. HIPÓTESIS**

- El virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino se encuentra presente en la mosca doméstica de una granja porcina positiva al virus en Yucatán, México.

### **4. OBJETIVO GENERAL**

- Detectar mediante la prueba de RT-PCR en tiempo real la presencia del virus de PRRS en la mosca doméstica (*Musca domestica*) de una granja porcina positiva al virus en Yucatán, México.

#### **4.1 Objetivos específicos**

- Confirmar la presencia del virus de PRRS mediante la detección de anticuerpos con una prueba de ELISA y del genoma viral mediante una prueba de RT-PCR en tiempo real en una granja porcina en Yucatán, México.
- Detectar la presencia del material genético del vPRRS en la mosca doméstica, mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real.

## 5. REFERENCIAS

1. Allende, R., Lewis T.L., Lu Z., Rock D.L., Kutish G.F., Ali A., Doster A.R., Osorio F.A. 1999. North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions. *J Gen Virol* 80 (Pt 2):307-315.
2. Arikawa, E., Y. Sun, J. Wang, Q. Zhou, B. Ning, S. L. Dial, L. Guo, J. Yang. 2008. Cross-platform comparison of SYBR® Green real-time PCR with TaqMan PCR, microarrays and other gene expression measurement technologies evaluated in the MicroArray Quality Control (MAQC) study. *BMC Genomics* 9:328
3. Barroso, M.G., Williams, J.J., Alzina, L.A. 2002. Identificación de factores de riesgo asociados a la exposición al virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino dentro de granjas porcinas del estado de Yucatán, México. *Vet México* 33(4):363-370.
4. Benfield, D.A., Nelson E., Collins, J.E., Harris, L., Goyal, S.M., Robison, D., Christianson, W.T., Morrison, R.B., Gorcyca, D., Chladek, D. 1992. Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). *J Vet Diagn Invest* 4(2):127-133.
5. Che, T.M., Song, M., Liu, Y., Johnson, R.W., Kelley, K.W., Van Alstine, W.G., Dawson, K.A., Pettigrew, J.E. 2012. Mannan oligosaccharide increases serum concentrations of antibodies and inflammatory mediators in weanling pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Anim Sci*, 90(8), 2784-2793.
6. Cho, J.G., Dee, S.A. 2006. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Theriogenology*, 66(3), 655-662.
7. Collins, J.E., Benfield, D.A., Christianson, W.T., Harris, L., Hennings, J.C., Shaw, D.P., Goyal, S.M., McCullough, S., Morrison, R.B., Joo, H.S., Gorcyca, D., Chladek, D. 1992. Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *J Vet Diagn Invest*, 4(2), 117-126.

8. Correa-Giron, P., Milian-Suazo, F., Canto-Alarcon, G. J., Anaya-Escalera, A. M., Weimersheimer-Rubi, J. 1994. Estudio seroepidemiologico para determinar la presencia de anticuerpos contra el virus del síndrome singenésico del cerdo en México. *Tec pecu Mex* (3), 139-144.
9. Davies, P.R. 2011. Intensive swine production and pork safety. *Foodborne Pathog Dis*, 8(2), 189-201.
10. De Regge, N., Cay, B. 2016. Comparison of PRRSV Nucleic Acid and Antibody Detection in Pen-Based Oral Fluid and Individual Serum Samples in Three Different Age Categories of Post-Weaning Pigs from Endemically Infected Farms. *PLoS One*, 7;11(11)
11. Dee, S.A., Schurrer, J.A., Moon, R.D., Fano, E., Trincado, C., Pijoan, C. (2004). Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus under field conditions during a putative increase in the fly population. *J Swine Health Prod*, 12(5), 242-245.
12. Delfín-González, H., Manrique-Saide, P.C., Meléndez-Ramírez V., Reyes-Novelo E. 2011. Insectos terrestres. En: *Técnicas de muestreo para manejadores de recursos naturales*. Editorial CIGA-UNAM. PP. 415 – 448.
13. Díaz Luque, I. Caracterización de la respuesta inmune de lechones durante la infección y tras la vacunación con el virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino. (Tesis doctoral). Universidad Autonoma de Barcelona.
14. Fasanella, A., Scasciamacchia, S., Garofolo, G., Giangaspero, A., Tarsitano, E., Adone, R. 2010. Evaluation of the house fly *Musca domestica* as a mechanical vector for an anthrax. *PLoS ONE* 5(8):e12219
15. Foy, C. A., Parkes. H. C. 2001. Emerging homogeneous DNA-based technologies in the clinical laboratory. *Clin Chem* 47:990-1000.
16. Gerber, P.F., O'Neill, K., Owolodun, O., Wang, C., Harmon, K., Zhang, J., Halbur, P.G., Zhou, L., Meng, X.J., Opriessnig, T. 2013. Comparison of commercial real-time reverse transcription-pcr assays for reliable, early, and rapid detection of heterologous strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in experimentally infected or noninfected boars by use of different sample types. *J Clin Microbiol*. 2013 Feb; 51(2):547-56
17. Goldberg, T.L., Lowe, J.F., Milburn, S.M., Firkins, L.D. 2003. Quasispecies variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus during natural infection. *Virology*, 317(2), 197-207.

18. Grove, D. S. 1999. Quantitative real-time polymerase chain reaction for the core facility using TaqMan and the Perkin-Elmer/Applied Biosystems Division 7700 Sequence Detector. *J Biomol Tech*, 10(1), 11-16.
19. Holtkamp, D.J., Polson, D.D., Torremorell, M., Morrison, B., Classen, D.M., Becton, L., Henry, S., Rodibaugh, M.T., Rowland, R.R., Snelson, H., Straw, B., Yeske P., Zimmerman, J. 2011. Terminology for classifying the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) status of swine herds. *Tierarztl Prax G N* 39(2), 101-112.
20. Holtkamp, D.J., Kliebenstein, J.B., Neumann, E.J., Zimmerman, J.J., Rotto, H.F., Yoder, T.K., Wang, C., Yeske, P.E., Mowrer, C.L., Haley, C.A.. 2013. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on United States pork producers. *J Swine Health Prod* 21(2), 72-84.
21. Hung, K.Y., Michailides, T.J., Millar, J.G., Wayadande, A., Gerry, A.C. 2015. House Fly (*Musca domestica* L.) Attraction to Insect Honeydew. *PLoS One* 13;10(5):e0124746
22. Jordán-Craviotto, A., Segura-Correa, J.C., Alzina-López, A., Rodríguez-Buenfil, J.C., Villegas-Pérez, S. 2010. Prevalence and risk factors associated with the PRRS virus in semen of boars in pig farms of Yucatan. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 12(1), 1-6.
23. Kukielka-Zunzunegui, D., Sánchez-Vizcaíno Rodríguez, J.M. 2008. Medidas de manejo del síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRS) basadas en su diagnóstico molecular. *RCCV* 2 (2); 187-193.
24. Lamontagne, L., Page, C., Laroche, R., Magar, R. 2003. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus persistence in blood, spleen, lymph nodes, and tonsils of experimentally infected pigs depends on the level of CD8 high T cells. *Viral Immunol*, 16(3), 395-406.
25. López-Heydeck, S.M., Huitrón-Bravo, G.G., Lagunas-Bernabé, S., Soriano-Vargas, E., Cabrera-Torres, A., de la Cruz-Valdés, F. 2013. Virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRSV) en granjas porcinas tecnificadas del Estado de México. *Rev. Mex de cienc pecuarias*, 4(4), 469-488.
26. López-Heydeck, S.M., Alonso-Morales, R.A., Mendieta-Zerón, H., Vázquez-Chagoyán, J.C. 2015. Síndrome reproductivo y respiratorio del cerdo (PRRS): Revisión. *Rev. Mex de cienc pecuarias*, 6(1), 69-89.
27. Morrow, W.E.M., Roberts, J. 2001. PRRS fact sheet for animal science. Disponible en: [https://www.ncsu.edu/project/swine\\_extension/publications/factsheets/817s.htm](https://www.ncsu.edu/project/swine_extension/publications/factsheets/817s.htm)

28. Muirhead, M.R., Alexander, T.J.L. 1997. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) – Disponible en: <http://www.thepigsite.com>
29. Murvosh, C.M., Thaggard, C.W. (1996). Ecological studies of the house fly. *Ann Entomol Soc Am*, 59(3), 533-547.
30. Nagy, A., Vitásková, E., Černíková, L., Křivda, V., Jiřincová, H., Sedlák, K., Horníčková, J., Havlíčková, M. 2017. Evaluation of TaqMan qPCR System Integrating Two Identically Labelled Hydrolysis Probes in Single Assay. *Sci Rep* 7.
31. Neumann, E.J., Kliebenstein, J.B., Johnson, C.D., Mabry, J.W., Bush, E.J., Seitzinger, A.H., Green, A.L. Zimmerman, J.J. 2005. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. *J Am Vet Med Assoc*, 227(3), 385-392.
32. Ni, J., Yang, S., Bounlom, D., Yu, X., Zhou, Z., Song, J., Khamphouth, V., Vatthana, T., Tian, K., 2012. Emergence and pathogenicity of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Vientiane, Lao People's Democratic Republic. *J Vet Diagn Invest*, 24(2), 349-354.
33. Okinaga, T., Yoshii, M., Suzuki, T., Miyazaki, A., Takagi, M., Tsunemitsu, H., T. Yamagishi 2009. Evaluation of unexpected positive results from a commercial ELISA for antibodies to PRRSV. *Vet Rec*, 164(15):455-459.
34. Opriessnig, T., Pallarés, F.J., Nilubol, D., Vincent, A.M., Thacker, E.I., Vaughn, E.M., Roof, M., 2005. Genomic homology of ORF 5 gene sequence between modified live vaccine virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus challenge isolates is not predictive of vaccine efficacy. *J Swine Health Prod* 13(5):246- 253.
35. Otake, S., Dee, S.A., Moon, R.D., Rossow, K.D., Trincado, C., Farnham, M., Pijoan, C. 2003. Survival of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in houseflies. *Can J Vet Res*, 67(3), 198-203.
36. Pitkin, A., Deen, J., Otake, S., Moon, R., Dee, S. 2009. Further assessment of houseflies (*Musca domestica*) as vectors for the mechanical transport and transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus under field conditions. *Can J Vet Res*, 73(2), 91-96.
37. Prieto, C., Suárez, P., Martín-Rillo, S., Simarro, I., Solana, A., Castro, J. M. 1996. Effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) on development of porcine fertilizedova in vitro. *Theriogenology*, 46(4), 687-693.

38. Ramírez-Freire, L., Alanís-Flores, G., Ayala-Barajas, R., Velazco-Macías C., Favela-Lara, S. 2014. El uso de platos trampa y red entomológica en la captura de abejas nativas en el estado de Nuevo León, México. *Acta Zool. Mex.* 30(3): 508-538.
39. Rovelo-Celorio, A., Alzina-López, A., Rodríguez-Buenfil, J. C., Villegas-Pérez, S., Segura-Correa, J.C. 2010. Prevalence and risk factors associated with the porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boars of pig farms at the southeastern Mexico. *Rev Cient-Fac Cien V*, 20(1), 17-23.
40. Stadejek, T., M. B. Oleksiewicz, D. Potapchuk, K. Podgorska. 2006. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains of exceptional diversity in eastern Europe support the definition of new genetic subtypes. *J Gen Virol* 87:1835-1841.
41. Sattler, T., Pikalo, J., Wodak, E., Schmoll, F. 2015. Performance of ELISAs for detection of antibodies against porcine respiratory and reproductive syndrome virus in serum of pigs after PRRSV type 2 live vaccination and challenge. *Porcine Health Manag* 11;1-19
42. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Ganadería. Producción Anual. Disponible en: URL: <http://www.siap.gob.mx/>
43. Schurrer, J.A., Dee, S.A., Moon, R.D., Rossow, K.D., Mahlum, C., Mondaca, E., Otake, S. Fano, E. Collins, J.E. Pijoan, C. 2004. Spatial dispersal of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-contaminated flies after contact with experimentally infected pigs. *Am J Vet Res*, 65(9), 1284-1292.
44. Schurrer, J.A., Dee, S.A., Moon, R.D., Murtaugh, M.P., Finnegan, C.P., Deen, J., Kleiboeker, S.B. Pijoan, C. 2005. Retention of ingested porcine reproductive and respiratory syndrome virus in houseflies. *Am J Vet Res*, 66(9), 1517-1525.
45. Thanapongtharm, W., Linard, C., Pamaranon, N., Kawkalong, S., Noimoh, T., Chanachai, K., Parakgamawongsa, T., Gilbert M. 2014. Spatial epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome in Thailand. *BMC Vet Res*, 10(1), 174.
46. Toplak, I., Rihtaric, D., Hostnik, P., Grom, J., Stukelj, M., Valencak, Z. 2012. Identification of a genetically diverse sequence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Slovenia and the impact on the sensitivity of four molecular tests. *J Virol Methods*, 179(1), 51-56.
47. Van Alstine, W.G., Stevenson, G.W., Kanitz, C.L. 1993. Diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome. *J Swine Health Prod*, 24-28. Disponible en: <https://www.aasv.org/shap/issues/>

48. Vishnukumar, S., Umamaheswaran, G., Anichavezhi, D., Indumathy, S., Adithan, C., Srinivasan, K., Kadambari, D. 2013. P-glycoprotein expression as a predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Indian J Cancer*, 50(3), 195-199.
49. Wang, Y.C., Chang, Y.C., Chuang, H.L., Chiu, C.C., Yeh, K.S., Chang, C.C., Hsuan S.L., Lin W.H., Chen T.H. 2011. Transmission of *Salmonella* between swine farms by the housefly (*Musca domestica*). *J Food Prot*, 74(6), 1012-1016.
50. Wasilk, A., Callahan, J. D., Christopher-Hennings, J., Gay, T. A., Fang, Y., Dammen, M., Reos, M.E., Torremorell, M., Polson, D., Mellencamp, M., Nelson, E., Nelson, W.M. 2004. Detection of U.S., Lelystad, and European-like porcine reproductive and respiratory syndrome viruses and relative quantitation in boar semen and serum samples by real-time PCR. *J Clin Microbiol*, 42(10), 4453-4461.
51. Weimersheimer-Rubí, J.E., Canto-Alarcón, G.J., Anaya-Escalera, A.M., Coba-Ayala, M.A., Milián-Suazo, F., Correa-Girón, P. 1997. Frecuencia de anticuerpos contra el virus del síndrome disgenésico y respiratorio en cerdos sacrificados en rastros de México. *Tec pecu Mex* (3), 139-144
52. Wensvoort, G., E. P. de Kluyver, E. A. Luitze, A. den Besten, L. Harris, J. E. Collins, W. T. Christianson, D. Chladek. 1992. Antigenic comparison of Lelystad virus and swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus. *J Vet Diagn Invest* 4:134-138.
53. Yang, Z. Z., Fang, W. H., Habib, M. 2006. First results of detection of PRRSV and CSFV RNA by SYBR Green I-based quantitative PCR. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 53(10), 461-467.

38 **6. ARTÍCULO.**

39 **REVISTA: TROPICAL ANIMAL HEALTH AND PRODUCTION**

40 **DETECCIÓN DEL VIRUS PRRS EN LA MOSCA DOMÉSTICA (*Musca domestica*)**  
41 **DE UNA GRANJA PORCINA EN YUCATÁN, MÉXICO.**

42 Gladys Isabela Noh Cuxim\*, Alejandro Alzina López\*\*, Guadalupe Ayora  
43 Talavera\*\*\*, José Alberto Rosado Aguilar\*\*

44

45 \*Estudiante de Maestría en Ciencias Agropecuarias. Campus de Ciencias  
46 Biológicas y Agropecuarias, FMVZ-UADY. Carretera Mérida-Xmatkuil, Km 15.5,  
47 Apartado postal 4-116, CP. 97100, Mérida Yucatán, México.

48 \*\*Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, FMVZ-UADY. Carretera Mérida-  
49 Xmatkuil, Km 15.5, Apartado postal 4-116, CP. 97100, Mérida Yucatán, México.

50 \*\*\*Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi”, UADY. C.43 s/n  
51 entre 96 Paseo de las Fuentes y 40 Col. Inalámbrica. Apartado postal 97225, Mérida  
52 Yucatán, México.

53

54 **AUTOR RESPONSABLE:** Gladys Isabela Noh Cuxim. Calle 29 N° 398 x 28 y 30.  
55 Fracc. Juan Pablo II. CP. 97246. Tel: (999) 1509971. Mérida Yucatán, México. E-  
56 mail: Gladys.noh@hotmail.com

57 **AUTOR REIMPRESIONES:** ALEJANDRO ALZINA LÓPEZ. Campus de Ciencias  
58 Biológicas y Agropecuarias, FMVZ-UADY. Carretera Mérida-Xmatkuil, Km 15.5,  
59 Apartado postal 4-116, CP. 97100, Mérida Yucatán, México. Tel: (999) 9475525. E-  
60 mail: [alzina@correo.uady.mx](mailto:alzina@correo.uady.mx)

61 **DETECTION OF PRRS VIRUS IN THE HOUSEFLY (*Musca domestica*) OF A PIG**  
62 **FARM IN YUCATÁN, MEXICO.**

63 **6.1 ABSTRACT**

64 The objective of this study was to detect the presence of the PRRS virus in the house  
65 fly (*Musca domestica*) using a pig population housed in the same barn under field  
66 conditions. A total of 1277 serological sampling data were analyzed, in order to know  
67 if there was circulation of the PRRS virus. 26 samples of oral fluids from pigs housed  
68 in pens were taken and 300 houseflies, which were grouped in 50 homogenates of  
69 6 flies each. In order to detect the nucleic acid of vPRRS by real time RT-PCR test.  
70 95.74% (1224/1277) of the sera were positive in the ELISA test. The nucleic acid of  
71 the PRRS virus was detected in 34.6% (9/26) of the oral fluids and in 4% (2/50) of  
72 the fly samples analyzed. Based on the obtained results, using the real time RT-PCR  
73 test, the PRRS virus is present in the housefly, however it should be mentioned that  
74 this study is not conclusive, so we suggest that further studies such as sequencing  
75 should be carried out.

76 **Keywords:** Housefly, PRRSV, RT-PCR, Swine

77 **RESUMEN**

78 El objetivo del estudio fue detectar la presencia del virus de PRRS en la mosca  
79 doméstica, (*Musca domestica*) utilizando una población de cerdos alojados en una  
80 misma nave, en condiciones de campo. Se analizaron un total de 1277 datos de  
81 muestreos serológicos con la prueba de ELISA (IDEXX HerdChek® X3 PRRS), con  
82 el fin de saber si había circulación del virus de PRRS. Adicionalmente se tomaron  
83 26 muestras de fluidos orales de cerdos alojados en corrales y se colectaron 300  
84 moscas domésticas, formando 50 homogenizados de 6 moscas cada uno, para la  
85 detección del ácido nucleico del virus del PRRS. Tanto los fluidos orales como los  
86 homogenizados se procesaron mediante la prueba de RT-PCR en tiempo real. El  
87 95.74% (1224/1277) de los sueros resultaron positivos a la prueba de ELISA. El  
88 ácido nucleico del virus de PRRS, fue detectado en el 34.6% (9/26) de los fluidos y  
89 en el 4% (2/50) de los homogenizados de mosca doméstica analizados. Con base  
90 a los resultados obtenidos, el virus de PRRS se encuentra presente en la mosca  
91 doméstica, sin embargo es importante mencionar que se requieren más estudios  
92 como la secuenciación para confirmar esta hipótesis. Se sugieren realizar más  
93 estudios.

94 **Palabras clave:** Mosca doméstica, vPRRS, RT-PCR, Porcinos

## 95 6.2 INTRODUCCIÓN

96 El virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (vPRRS, por sus siglas en  
97 inglés), es un virus de amplia distribución, con efectos negativos en la industria  
98 porcina. La enfermedad del virus de PRRS es la responsable de las mayores  
99 pérdidas económicas en la industria porcina (Neumann *et al.*, 2005). En Estados  
100 Unidos en el 2011, se estimó una pérdida anual de alrededor de \$664 millones de  
101 dólares (Holtkamp *et al.*, 2013).

102 El agente etiológico de PRRS, es un virus ARN, de cadena simple, en sentido  
103 positivo y envuelto, pertenece al orden de los *Nidovirales*, de la familia *Arteriviridae*  
104 y al género *Arterivirus* (Cho y Dee, 2006). Debido a las diferencias en la secuencia  
105 de sus nucleótidos, se han clasificado en dos genotipos, el tipo Europeo o tipo 1  
106 (PRRSV-1), constituido por la cepa Lelystad y el genotipo Americano o tipo 2  
107 (PRRSV-2), cuyo prototipo es el aislado ATCC-VR-2332. Ambos genotipos  
108 comparten aproximadamente 63.4% de identidad a nivel genómico (Wensvoort *et*  
109 *al.*, 1991; Collins *et al.*, 1992; Allende *et al.*, 1999).

110 Existen diferentes estrategias de control contra esta enfermedad, entre ellas está la  
111 vacunación, el uso de inóculos con cepas provenientes de la misma granja,  
112 infección natural de animales y uso de autoreemplazos (Batista *et al.*, 2002; Batista  
113 *et al.*, 2004; Fano *et al.*, 2005). La transmisión puede darse entre los cerdos, debido  
114 a la densidad de población mediante el contacto directo o por secreciones  
115 contaminadas, como el semen, sangre y saliva (Cho y Dee, 2006), agujas, fómites  
116 (overoles y botas) y vectores mecánicos como los dípteros (Otake *et al.*, 2003).  
117 Cuando el virus se presenta por primera vez dentro de una granja porcina, se  
118 difunde rápidamente (Jordán-Craviotto *et al.*, 2010).

119 Las moscas son insectos que pertenecen al orden Díptera, considerados agentes  
120 potenciales en la transmisión de enfermedades (Fasanella *et al.*, 2010). Son  
121 comunes en las granjas porcinas, donde se desarrollan y se alimentan de los  
122 residuos de animales y es donde estos dípteros pueden adquirir bacterias, virus o  
123 parásitos a través de sus partes bucales (al ingerir líquidos de tejidos animales,  
124 incluyendo sangre, suero, saliva, moco y secreciones lacrimales), en pelos de su

125 cuerpo y patas. Estos insectos al defecar y regurgitar (Schurrer *et al.*, 2005; Wang  
126 *et al.*, 2011) pueden infectar a animales y seres humanos con los agentes adquiridos  
127 (Hung *et al.*, 2015). Se ha demostrado que las moscas actúan como vectores para  
128 transmisión de patógenos (Murvosh y Thaggard, 1996), como el vPRRS (Otake *et*  
129 *al.*, 2003).

130 Con respecto a los insectos, existen estudios publicados previamente, que han  
131 demostrado que la mosca doméstica (*Musca domestica*) podrían servir como  
132 vectores del vPRRS, sin embargo el virus no se replicaba dentro de esta especie lo  
133 que significa que no podría actuar como vector biológico (Otake *et al.*, 2003; Dee *et*  
134 *al.*, 2004; Schurrer *et al.*, 2004; Schurrer *et al.*, 2005).

135 No obstante, aunque estos estudios presentan resultados interesantes, todos  
136 poseen limitaciones, como la realización en condiciones de laboratorio, que  
137 involucran un pequeño número de animales. El objetivo de este estudio, fue  
138 detectar mediante la prueba de RT-PCR en tiempo real la presencia del virus de  
139 PRRS en la mosca doméstica (*Musca domestica*) de una granja porcina positiva al  
140 virus en Yucatán, México.

## 141 **6.3 MATERIALES Y MÉTODOS**

### 142 **6.3.1 Área de estudio**

143 El estudio se realizó en una granja porcina de Yucatán, la cual se encuentra  
144 localizada en el municipio de Muna, Yucatán; entre las coordenadas 20° 33" y 30°  
145 35" latitud norte y 89° 42" y 14° 14" longitud oeste del meridiano de Greenwich. El  
146 clima de la región es tropical subhúmedo con lluvias en verano (mayo a octubre).  
147 La temperatura varía entre 35°C y 40°C, la humedad relativa entre 61-87% y vientos  
148 predominantes de norte a sureste (INEGI, 2009).

### 149 **6.3.2 Granja de estudio**

150 La granja de estudio fue seleccionada por conveniencia, con base en su sistema de  
151 producción tecnificado, de flujo continuo y de ciclo completo. Tiene una población  
152 de 5,500 vientres. Para el control y la prevención de las principales enfermedades  
153 que afectan a los cerdos de la granja, utilizan esquemas de vacunación acorde a la  
154 etapa de desarrollo del animal. La granja es positiva activa y estable al vPRRS, de  
155 acuerdo a la clasificación de Holtkamp *et al.* (2011). Para el control de esta  
156 enfermedad en la granja se utilizan cerdas de autoreemplazo y no vacunan. Éstas  
157 se crían junto con los cerdos para abasto y una vez que las cerdas tienen  
158 aproximadamente 140 días de edad son seleccionadas y antes de su traslado a un  
159 área de aclimatación, se toman muestras de suero a la totalidad del lote  
160 seleccionado y solo las que resulten positivas son trasladadas. Para ingresar al hato  
161 reproductor deben contar con un mínimo de 210 días de edad, peso aproximado de  
162 140 kg y que hayan presentado cuando menos un celo previo a la inseminación.

### 163 **6.3.3 Diseño experimental**

164 Se realizó un estudio descriptivo transversal por conveniencia en una población de  
165 moscas domésticas en una nave de cerdas destinadas al autoreemplazo, que están  
166 distribuidos en 72 corrales con aproximadamente 11 animales cada uno.

### 167 **6.3.4 Confirmación de la circulación del virus de PRRS**

168 La circulación del virus de PRRS en los cerdos, fue indispensable para determinar  
169 su presencia en las moscas. Las muestras de suero se obtuvieron por punción de  
170 la vena cava. Para la detección de anticuerpos, la granja utiliza de forma rutinaria,  
171 la prueba de ELISA, con el kit comercial IDEXX (HerdCheck PRRS X3, USA),  
172 siguiendo las recomendaciones del fabricante. El punto de corte para determinar un  
173 suero positivo fue de  $S/P \geq 0.40$ . Esta prueba se realizó en los laboratorios de  
174 análisis clínicos de la FMVZ-UADY.

175 Se tomaron 26 muestras de fluido oral (FO) en los corrales. Se utilizaron sogas de  
176 algodón crudo de tres hebras, por corral (Prickett y Zimmerman, 2010) y se  
177 colocaron durante 20 minutos. El tamaño de muestra fue obtenido considerando  
178 una prevalencia estimada de la enfermedad del 10% y un nivel de confianza de 95%  
179 (Nathues, 2013) mediante el programa WinEpi© 2006. Las muestras fueron  
180 almacenadas en neveras de unicel con refrigerantes y enviadas al laboratorio, para  
181 su procesamiento.

### 182 **6.3.6 Obtención de mosca doméstica**

183 El tamaño de muestra obtenido mediante el programa WinEpi© 2006, fue de 300  
184 moscas, considerando una prevalencia de la enfermedad del 1% y un nivel de  
185 confianza de 95%. La colecta de moscas se realizó empleando una red  
186 entomológica de golpeo (Roulston *et al.* 2007; Ramírez *et al.* 2014). El transecto

187 (largo de la nave) de muestreo se dividió en 6 secciones, procurando que estén a  
188 una distancia de 15 metros entre ellas. Las moscas colectadas se depositaron en  
189 una caja de malla para insectos (“mesh cage”) y fueron congeladas a -80 °C, para  
190 su “sacrificio”. Posteriormente se seleccionaron las 300 moscas domésticas, las  
191 cuales fueron depositadas en tubos estériles de eppendorf, formando pools de 6  
192 moscas cada uno y dando un total de 50 muestras (Otake *et al.*, 2003; Otake *et al.*,  
193 2004). Se comprimieron contra la pared del tubo, adicionando 500 µl de buffer  
194 fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés) y se centrifugó a 14'000 RPM durante  
195 5 minutos, obteniendo el sobrenadante (Otake *et al.*, 2003).

#### 196 **6.3.7 Extracción de ARN viral**

197 Se realizó la extracción a un total de 76 muestras, entre fluidos orales (n=26) y  
198 homogenizados de mosca doméstica (n=50) a partir de 140 µl, empleando un kit  
199 comercial QIAamp® Viral RNA Mini Kit (250), de acuerdo con las recomendaciones  
200 del fabricante. El ARN obtenido se almacenó a -20°C hasta su uso en aplicaciones  
201 moleculares posteriores.

#### 202 **6.3.8 Análisis de Fluido Oral y homogenizados de mosca doméstica por RT- 203 PCR en tiempo real.**

204 Todas las muestras de FO y homogenizados de mosca doméstica se analizaron dos  
205 veces para detectar el ácido nucleico del vPRRS mediante la prueba de RT-PCR en  
206 tiempo real (VetMAX™ NA and EU PRRSV and Xeno™ RNA Controls de Applied  
207 Biosystems), siguiendo la instrucciones del fabricante y utilizando la secuencia del  
208 ORF 7. Para que las muestras se consideren positivas, el ácido nucleico del vPRRS  
209 debía ser detectado en ambas pruebas (Egli *et al.*, 2001). Las muestras con solo  
210 una reacción positiva se consideraron sospechosas.

211 La amplificación de ARN, se realizó utilizando un termociclador Applied  
212 Biosystems® 7500 Real-Time PCR Systems (Thermo Fisher Scientific), bajo  
213 condiciones especificadas en el cuadro 1. El punto de corte fue de un ciclo umbral  
214 (CT) <37 ciclos para considerar muestras positivas.

## 215 **6.4 RESULTADOS**

### 216 **Confirmación de la circulación del virus de PRRS**

217 Se analizaron un total de 1277 sueros de cerdas mediante la prueba de ELISA,  
218 divididas en seis grupos. Los resultados de la prueba IDEXX HerdChek® X3 PRRS,  
219 arrojaron 1224 sueros (95.74%) que resultaron positivos a la prueba con S/P  $\geq 0.4$   
220 de acuerdo a las instrucciones del fabricante (figura 1). En el primer grupo se  
221 obtuvieron 98.9% de positivos (179/181), en el segundo 99.45% (181/182), en el  
222 tercero 98.33 (235/239), en el cuarto 97.19% (277/285), en el quinto 97.94%  
223 (190/194) y finalmente en el sexto grupo un 82.65% (162/196).

224 En la primera corrida por RT-PCR en tiempo real en las muestras de FO, 9 muestras  
225 resultaron positivas, sin embargo en una segunda corrida para su confirmación, solo  
226 8 de las 9 resultaron positivas, representando un 30.7% (8/26).

### 227 **Análisis de homogenizados de mosca doméstica por RT-PCR en tiempo real**

228 El ácido nucleico del virus de PRRS fue detectado, en el 4% (2/50) de los  
229 homogenizados, en un segundo análisis para su confirmación, solo una de 2  
230 muestras, resultó positiva. La figura 2 representa gráficos de amplificación del virus  
231 de PRRS, el eje “y” es la producción de fluorescencia y el eje “x” es el número de  
232 ciclos de la reacción. El control positivo de la primera corrida amplificó en el ciclo  
233 29. Para la segunda corrida de RT-PCR en tiempo real, se utilizó un control positivo  
234 de un aislamiento viral, el cual amplificó en el ciclo 17.

235

236

## 237 6.5 DISCUSIÓN

238 El estatus de la granja como positiva al vPRRS, se confirmó mediante la detección  
239 de anticuerpos específicos, en cerdas destinadas al autoreemplazo. La alta  
240 prevalencia (>95%) de estos anticuerpos corresponden a patrones de circulación  
241 de virus y desarrollo de anticuerpos en granjas infectadas endémicamente (Albina,  
242 1997; Nodelijk *et al.*, 1997). Este alto porcentaje, podría deberse a que los cerdos  
243 se muestrean 19 semanas después de haber permanecido en una misma nave, con  
244 cerdos (lotes) de diferentes edades que van de entre 6 a 20 semanas de edad. Sin  
245 embargo, esto no significa que están eliminando al virus. La corta duración de la  
246 inmunidad pasiva en los lechones, puede hacerlos susceptibles a la infección o  
247 reinfección natural. Geldhof *et al.*, (2013) realizaron un estudio, donde encontraron  
248 anticuerpos contra el vPRRS en lechones, transmitidos a través del calostro y fueron  
249 detectables en el suero de estos animales hasta 5 semanas después del parto.

250 Los animales del estudio se muestrearon a los 140 días de edad, Flores-Mendoza  
251 y Hernández, (2010), mencionan que los anticuerpos producidos Por la infección  
252 con vPRRS pueden permanecer por períodos largos pero con títulos bajos.

253 El alto porcentaje de animales encontrados seropositivos, demuestran la presencia  
254 de una infección o reinfección natural, estudios demuestran que los anticuerpos IgG  
255 pueden encontrarse entre los 7 y 15 días post infección, permaneciendo constantes  
256 durante meses y declinando entre los 135 y 300 días post infección (Nelson *et al.*,  
257 1994; Batista *et al.*, 2004 y Li *et al.*, 2014).

258 Se realizó la detección del ARN del vPRRS en FO mediante la prueba de RT-PCR  
259 en tiempo real, el virus fue detectable en el 34.6% (9/26) de las muestras. Olsen *et*  
260 *al.*, (2013) informaron una probabilidad de más del 90% para detectar al vPRRS,  
261 mediante la prueba de PCR en fluido oral, de corrales que contenían el 36% de  
262 cerdos vacunados. Por otra parte en un estudio realizado por De Regge y Cay,  
263 (2016), obtuvieron una alta especificidad (96%) en muestras de FO probadas  
264 mediante RT-PCR en tiempo real.

265 Por su parte Prickett et al., (2008) probaron muestras de FO y suero para la  
266 detección del vPRRS, con cerdos de 3, 5, 8, 12 y 16 semanas de edad, que fueron  
267 infectados con el vPRRS, y obtuvieron una concordancia del 77% entre los de FO y  
268 suero.

269 Una posible explicación de los bajos porcentajes de detección del virus en FO, es  
270 que pocos animales se encontraban eliminando el virus en saliva ya que la  
271 transmisión del vPRRS en los animales estudiados, se da en forma natural  
272 ocasionando que los momentos de contacto sean diferentes; generando una  
273 dilución con la saliva negativa, por lo cual las muestras de FO pudieron quedar por  
274 abajo del límite de detección de la prueba. Seddon *et al.*, (2012) reportaron que  
275 aproximadamente el 80% de los cerdos de un corral, mastican la cuerda dentro de  
276 los 30 minutos posteriores a su colocación. La prueba de RT-PCR en tiempo real  
277 en FO tienen un alta sensibilidad, cuando el 30% de los cerdos individualmente  
278 está eliminando al virus (De Regge y Cay, 2016).

279 Diversos autores como Prickett *et al.*, (2010a) y Decorte *et al.*, (2013), mencionan  
280 que cuando la carga viral es muy baja, las muestra durante el período de  
281 conservación se deterioran, pudiendo dar como resultado un falso negativo, lo cual  
282 no es muy probable en este estudio ya que se cuidó la cadena fría.

283 Estudios previamente publicados, han encontrado que la mosca doméstica (*M.*  
284 *domestica*) podrían ser un vector mecánico del vPRRS (Otake *et al.*, 2002). La  
285 mosca doméstica puede transportar agentes patógenos, mediante su estructura  
286 morfológica (Förster *et al.*, 2007). En este estudio el ácido nucleico del vPRRS se  
287 detectó en el 4% (2/50) aunque una de estas dos, en una segunda corrida resultó  
288 negativa mediante la prueba de RT-PCR en tiempo real. Esto pudo deberse al  
289 manejo que recibió la muestra, ya que una vez que se extrajo en ARN, éste se  
290 congeló pudiendo haberse degradado el ARN (Hernández *et al.*, 1994).

291 Con base al tamaño de muestra, el virus se encuentra en una cantidad que pudiera  
292 ser importante en la diseminación ya que se requieren pocas partículas virales para  
293 establecer una infección (Morrow y Roberts, 2001). Una posible explicación para la

294 ausencia del virus de PRRS en homogenizados de moscas, podría deberse a un  
295 bajo número de cerdos virémicos o bajas cargas de eliminación del virus por cerdo  
296 infectado (Pitkin *et al.*, 2009), también a la cantidad de virus en las moscas para que  
297 este pudiera ser detectado (Otake *et al.*, 2002). Schurrer *et al.*, (2005) propone que  
298 la retención del virus en las moscas, parece estar relacionada con la carga viral  
299 inicial después de la ingestión y la temperatura ambiental.

300 En un estudio realizado por Otake *et al.*, (2003), se detectó mediante RT-PCR en  
301 tiempo real, que el vPRRS, puede permanecer viable en el tracto intestinal de la  
302 mosca doméstica, hasta por 12 horas después de alimentarse de fluidos de un cerdo  
303 infectado, pero sólo por un corto período en la superficie externa de las moscas. Por  
304 otro lado Schurrer *et al.*, (2005), encontraron que el vPRRS puede permanecer 48  
305 horas en la mosca, después de su exposición al virus, sin embargo el porcentaje de  
306 moscas positivas y la carga viral disminuye con el tiempo.

307 La capacidad del vPRRS para residir dentro del cuerpo de una mosca doméstica,  
308 sugiere que puede protegerlo contra ciertos factores ambientales, que se sabe  
309 afecta la supervivencia del vPRRS fuera del huésped, como la luz ultravioleta y el  
310 secado (Benfield *et al.*, 1992). Sin embargo (Grübel *et al.*, 1997) menciona que el  
311 intestino medio de la mosca doméstica tiene un pH ácido de 3.1, lo cual podría ser  
312 otra explicación al bajo número de muestras positivas, ya que el vPRRS permanece  
313 viable a un pH entre 6.0 y 7.65 (Bloemraad *et al.*, 1994) disminuyendo así la  
314 posibilidad de encontrar al virus en los macerados.

315 Aunque no fue motivo de este trabajo, hay estudios que mencionan la capacidad de  
316 vuelo de la *M. domestica* la cual, le adiciona ser un factor de riesgo en la transmisión  
317 de enfermedades; Schurrer *et al.*, (2004) reportaron que el vuelo de la *M. domestica*  
318 excede los 5 km, con una dispersión de distancia máxima de 33 km. Es importante  
319 mencionar que la granja de estudio, se encuentra ubicada en una zona con amplia  
320 población de cerdos en menos de 10 km. En el presente estudio no se evaluaron  
321 épocas del año, sin embargo es posible que sea necesario, ya que existen reportes  
322 de aumentos estacionales anuales en el número de brotes observados, con una

323 baja incidencia durante la primavera y el verano, y alta durante el otoño y el invierno  
324 (Tousignant *et al.*, 2015). Esto puede ser motivos de investigaciones a futuro.

## 325 **6.6 CONCLUSIÓN**

326 Con base a los resultados obtenidos, mediante la prueba de RT-PCR en tiempo real  
327 utilizada, el virus de PRRS está presente en la mosca doméstica, sin embargo se  
328 necesitan más estudios epidemiológicos y moleculares, antes de poder llegar a una  
329 conclusión final con respecto a la importancia de las moscas domésticas en la  
330 transmisión del virus de PRRS entre granjas productoras de cerdos.

331 **6.7 REFERENCIAS**

- 332 Albina, E. (1997). Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome  
333 (PRRS): An overview. *Veterinary Microbiology*, 55(1), 309-316.
- 334 Allende, R., Lewis T.L., Lu Z., Rock D.L., Kutish G.F., Ali A., Doster A.R., Osorio F.A.  
335 1999. North American and European porcine reproductive and respiratory  
336 syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions. *Journal of General*  
337 *Virology* 80 (Pt 2): 307-315.
- 338 Batista, L., Pijoan, C., Torremorell, M. 2002. Experimental injection of gilts with porcine  
339 reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) during acclimatization.  
340 *Journal of Swine Health and Production*, 10(4), 147-150.
- 341 Batista, L., Pijoan, C., Dee, S., Olin, M., Molitor, T., Joo, H. S., Xiao Z., Murtaugh M.  
342 2004. Virological and immunological responses to porcine reproductive and  
343 respiratory syndrome virus in a large population of gilts *Canadian Journal of*  
344 *Veterinary Research* (Vol. 68, pp. 267-273).
- 345 Benfield, D.A., Nelson E., Collins, J.E., Harris, L., Goyal, S.M., Robison, D.,  
346 Christianson, W.T., Morrison, R.B., Gorcyca, D., Chladek, D. (1992).  
347 Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate  
348 ATCC VR-2332). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 4(2):127-133.
- 349 Bloemraad, M., de Kluijver, E. P., Petersen, A., Burkhardt, G. E., Wensvoort, G. (1994).  
350 Porcine reproductive and respiratory syndrome: temperature and pH. *Veterinary*  
351 *Microbiology* 1994 Dec; 42(4):361-71.
- 352 Che, T.M., Song, M., Liu, Y., Johnson, R.W., Kelley, K.W., Van Alstine, W.G., Dawson,  
353 K.A., Pettigrew, J.E. (2012). Mannan oligosaccharide increases serum  
354 concentrations of antibodies and inflammatory mediators in weanling pigs  
355 experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus.  
356 *Journal of Animal Science* 90(8), 2784-2793.

357 Chen, C., Fan, W., Jia, X., Li, J., Bi, Y., Liu, W. (2013). Development of a recombinant  
358 N-Gp5c fusion protein-based ELISA for detection of antibodies to porcine  
359 reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Virological Methods*  
360 189(1), 213-220.

361 Cho, J.G., Dee, S.A. (2006). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus.  
362 *Theriogenology*, 66(3), 655-662.

363 Collins, J.E., Benfield, D.A., Christianson, W.T., Harris, L., Hennings, J.C., Shaw, D.P.,  
364 Goyal, S.M., McCullough, S., Morrison, R.B., Joo, H.S., Gorcyca, D., Chladek, D.  
365 1992. Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-  
366 2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic  
367 pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 4(2), 117-126.

368 De Regge, N., Cay, B. 2016. Comparison of PRRSV Nucleic Acid and Antibody  
369 Detection in Pen-Based Oral Fluid and Individual Serum Samples in Three Different  
370 Age Categories of Post-Weaning Pigs from Endemically Infected Farms. *PLOS*  
371 *ONE* 7;11(11)

372 Dee, S.A., Schurrer, J.A., Moon, R.D., Fano, E., Trincado, C., Pijoan, C. 2004.  
373 Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus under field  
374 conditions during a putative increase in the fly population. *Journal of Swine Health*  
375 *and Production* 12(5), 242-245.

376 Decorte, I., Van der Stede, Y., Nauwynck, H., De Regge, N., & Cay, A. B. 2013. Effect  
377 of saliva stabilisers on detection of porcine reproductive and respiratory syndrome  
378 virus in oral fluid by quantitative reverse transcriptase real-time PCR. *The*  
379 *Veterinary Journal* 197(2), 224-228.

380 Egli, C., Thur, B., Liu, L., Hofmann, M. A. (2001). Quantitative TaqMan RT-PCR for the  
381 detection and differentiation of European and North American strains of porcine  
382 reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Virological Methods* 98(1),  
383 63-75.

384 Fano, E., Olea, L., Pijoan, C. 2005. Eradication of porcine reproductive and respiratory  
385 syndrome virus by serum inoculation of naïve gilts Canadian Journal of Veterinary  
386 Research, (Vol. 69, pp. 71-74).

387 Fasanella, A., Scasciamacchia, S., Garofolo, G., Giangaspero, A., Tarsitano, E.,  
388 Adone, R. 2010. Evaluation of the house fly *Musca domestica* as a mechanical  
389 vector for an anthrax. PLOS ONE 5(8):e12219

390 Flores-Mendoza, L., Hernández, J. 2010. Vacunas contra el virus del síndrome  
391 reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV): escribiendo una historia. Veterinaria  
392 México 41(2), 139-159.

393 Förster, M., Klimpel, S., Mehlhorn, H., Sievert, K., Messler, S., Pfeffer, K. 2007. Pilot  
394 study on synanthropic flies (e.g. *Musca*, *Sarcophaga*, *Calliphora*, *Fannia*, *Lucilia*,  
395 *Stomoxys*) as vectors of pathogenic microorganisms. Parasitology Research  
396 101(1), 243-246.

397 Geldhof, M. F., Van Breedam, W., De Jong, E., Lopez Rodriguez, A., Karniychuk, U.  
398 U., Vanhee, M., Van Doorselaere J., Maes D., Nauwynck H.J. 2013. Antibody  
399 response and maternal immunity upon boosting PRRSV-immune sows with  
400 experimental farm-specific and commercial PRRSV vaccines. Veterinary  
401 Microbiology 167(3-4), 260-271.

402 Grubel, P., Hoffman, J. S., Chong, F. K., Burstein, N. A., Mepani, C., Cave, D. R. 1997.  
403 Vector potential of houseflies (*Musca domestica*) for *Helicobacter pylori*. Journal of  
404 Clinical Microbiology 35(6), 1300-1303.

405 Hernández, A., Martín Vasallo, P., Torres, A., Salido, E. 1994. Análisis del RNA:  
406 Estudio de la expresión génica. Nefrología Vol. 14 N° 2

407 Holtkamp, D.J., Kliebenstein, J.B., Neumann, E.J., Zimmerman, J.J., Rotto, H.F.,  
408 Yoder, T.K., Wang, C., Yeske, P.E., Mowrer, C.L., Haley, C.A.. 2013. Assessment  
409 of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on

410 United States pork producers. Journal of Swine Health and Production, 21(2), 72-  
411 84.

412 Hung, K.Y., Michailides, T.J., Millar, J.G., Wayadande, A., Gerry, A.C. (2015). House  
413 Fly (*Musca domestica* L.) Attraction to Insect Honeydew. PLOS ONE  
414 13;10(5):e0124746

415 INEGI 2009. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos  
416 Mexicanos. Muna, Yucatán. Clave geoestadística 31053

417 Jordán-Craviotto, A., Segura-Correa, J.C., Alzina-López, A., Rodríguez-Buenfil, J.C.,  
418 Villegas-Pérez, S.( 2010). Prevalence and risk factors associated with the PRRS  
419 virus in semen of boars in pig farms of Yucatan. Tropical and Subtropical  
420 Agroecosystems, 12(1), 1-6.

421 Li, X., Galliher-Beckley, A., Pappan, L., Tribble, B., Kerrigan, M., Beck, A., Hesse R.,  
422 Blecha, F., Nietfeld J.C., Rowland, R.R., Shi J. (2014). Comparison of host immune  
423 responses to homologous and heterologous type II porcine reproductive and  
424 respiratory syndrome virus (PRRSV) challenge in vaccinated and unvaccinated  
425 pigs. BioMed Research International 2014, 416727.

426 Morrow, W.E.M., Roberts, J. 2001. PRRS fact sheet for animal science.  
427 [https://projects.ncsu.edu/project/swine\\_extension/publications/factsheets/817s.pdf](https://projects.ncsu.edu/project/swine_extension/publications/factsheets/817s.pdf)  
428 [f](#)

429 Murvosh, C.M., Thaggard, C.W. 1996. Ecological studies of the house fly. Annals of  
430 the Entomological Society of America 59(3), 533-547.

431 Nathues, H. 2013. Swine sampling - Oral fluids. from  
432 [https://www.thermofisher.com/mx/es/home/industrial/animal-health/diagnostics-](https://www.thermofisher.com/mx/es/home/industrial/animal-health/diagnostics-at-work/swine-sampling-oral-fluids.html)  
433 [at-work/swine-sampling-oral-fluids.html](https://www.thermofisher.com/mx/es/home/industrial/animal-health/diagnostics-at-work/swine-sampling-oral-fluids.html)

434 Nelson, E.A., Christopher-Hennings, J., Benfield, D.A., 1994. Serum immune  
435 responses to the proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome  
436 (PRRS) virus. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 6, 410–415.

437 Neumann, E.J., Kliebenstein, J.B., Johnson, C.D., Mabry, J.W., Bush, E.J., Seitzinger,  
438 A.H., Green, A.L. Zimmerman, J.J. 2005. Assessment of the economic impact of  
439 porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United  
440 States Journal of the American Veterinary Medical Association 227(3), 385-392.

441 Olsen, C., Karriker, L., Wang, C., Binjawadagi, B., Renukaradhya, G., Kittawornrat, A.,  
442 Lizano S., Coetzee, J., Main, R., Meiszberg, A., Panyasing, Y., Zimmerman J.  
443 2013. Effect of collection material and sample processing on pig oral fluid testing  
444 results. The Veterinary Journal 198(1), 158-163.

445 Otake, S., Dee, S.A., Rossow, K.D., Moon, R.D., Pijoan, C. 2002. Mechanical  
446 transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by  
447 mosquitoes, *Aedes vexans* (Meigen). Canadian Journal of Veterinary Research,  
448 66(3), 191-195.

449 Otake, S., Dee, S.A., Moon, R.D., Rossow, K.D., Trincado, C., Farnham, M., Pijoan, C.  
450 2003. Survival of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in houseflies.  
451 Canadian Journal of Veterinary Research, 67(3), 198-203.

452 Otake, S., Dee, S. A., Moon, R. D., Rossow, K. D., Trincado, C., Pijoan, C. 2004.  
453 Studies on the carriage and transmission of porcine reproductive and respiratory  
454 syndrome virus by individual houseflies (*Musca domestica*). Veterinary Record  
455 154(3), 80-85.

456 Pitkin, A., Deen, J., Otake, S., Moon, R., Dee, S. 2009. Further assessment of  
457 houseflies (*Musca domestica*) as vectors for the mechanical transport and  
458 transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus under field  
459 conditions. Canadian Journal of Veterinary Research 73(2), 91-96.

460 Prickett, J., Kim, W., Simer, R., Yoon, K.J., Zimmerman, J. (2008). Oral-fluid samples  
461 for surveillance of commercial growing pigs for porcine reproductive and respiratory  
462 syndrome virus and porcine circovirus type 2 infections. Journal of Swine Health  
463 and Production. 16(2):86–91.

464 Prickett, J., Zimmerman, J.J. 2010. The development of oral fluid-based diagnostics  
465 and applications in veterinary medicine. *Animal Health Research Reviews* 11(2),  
466 207-216.

467 Prickett, J.R., Cutler, S., Kinyon, J., Naberhaus, N., Stensland, W.R., Yoon, K.-J.,  
468 Zimmerman, J.J. 2010a. Stability of porcine reproductive and respiratory syndrome  
469 virus and antibody in swine oral fluid. *Journal of Swine Health and Production* 18,  
470 187–195.

471 Ramírez-Freire, L., Alanís-Flores, G., Ayala-Barajas, R., Velazco-Macías C., Favela-  
472 Lara, S. (2014). El uso de platos trampa y red entomológica en la captura de abejas  
473 nativas en el estado de Nuevo León, México. *Acta Zoológica Mexicana* 30(3): 508-  
474 538.

475 Roulston, T.H., Smith, S.A. Brewster, A.L. (2007). A comparison of pan trap and  
476 intensive net sampling techniques for documenting a bee (Hymenoptera:  
477 Apiformes) fauna *Kansas Entomological Society* 179–181.

478 Seddon, Y. M., Guy, J. H., & Edwards, S. A. 2012. Optimising oral fluid collection from  
479 groups of pigs: effect of housing system and provision of ropes. *The Veterinary*  
480 *Journal* 193(1), 180-184.

481 Schurrer, J.A., Dee, S.A., Moon, R.D., Rossow, K.D., Mahlum, C., Mondaca, E., Otake,  
482 S. Fano, E. Collins, J.E. Pijoan, C. 2004. Spatial dispersal of porcine reproductive  
483 and respiratory syndrome virus-contaminated flies after contact with experimentally  
484 infected pigs. *American Journal of Veterinary Research* 65(9), 1284-1292.

485 Schurrer, J.A., Dee, S.A., Moon, R.D., Murtaugh, M.P., Finnegan, C.P., Deen, J.,  
486 Kleiboeker, S.B. Pijoan, C. 2005. Retention of ingested porcine reproductive and  
487 respiratory syndrome virus in houseflies. *American Journal of Veterinary Research*  
488 66(9), 1517-1525.

489 Steinrigl, A., Revilla-Fernandez, S., Wodak, E., Schmoll, F., Sattler, T. 2014.  
490 Comparative evaluation of serum, FTA filter-dried blood and oral fluid as sample  
491 material for PRRSV diagnostics by RT-qPCR in a small-scale experimental study.  
492 Berl Munch Tierarztl Wochenschr, 127(5-6), 216-221.

493 Tousignant, S. J., Perez, A. M., Lowe, J. F., Yeske, P. E., Morrison, R. B. 2015.  
494 Temporal and spatial dynamics of porcine reproductive and respiratory syndrome  
495 virus infection in the United States American Journal of Veterinary Research 76(1),  
496 70-76.

497 Wang, Y.C., Chang, Y.C., Chuang, H.L., Chiu, C.C., Yeh, K.S., Chang, C.C., Hsuan  
498 S.L., Lin W.H., Chen T.H. 2011. Transmission of Salmonella between swine farms  
499 by the housefly (*Musca domestica*). Journal of Food Protection 74(6), 1012-1016.

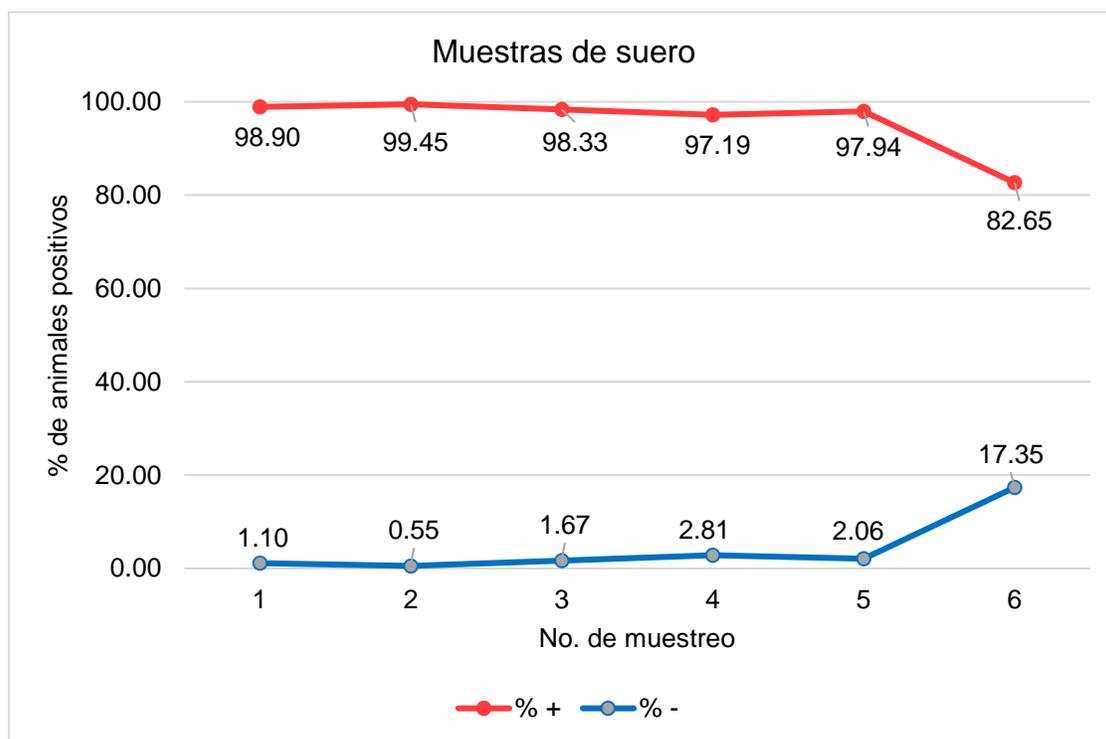
500 Wensvoort, G., E. P. de Kluyver, E. A. Luitze, A. den Besten, L. Harris, J. E. Collins,  
501 W. T. Christianson, D. Chladek. 1992. Antigenic comparison of Lelystad virus and  
502 swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus. Journal of Veterinary  
503 Diagnostic Investigation 4:134-138.

504 Zuckermann, F. A., Garcia, E. A., Luque, I. D., Christopher-Hennings, J., Doster, A.,  
505 Brito, M., Osorio F. 2007. Assessment of the efficacy of commercial porcine  
506 reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccines based on  
507 measurement of serologic response, frequency of gamma-IFN-producing cells and  
508 virological parameters of protection upon challenge. Veterinary Microbiology  
509 123(1-3), 69-85.

510 **6.8 ANEXO**

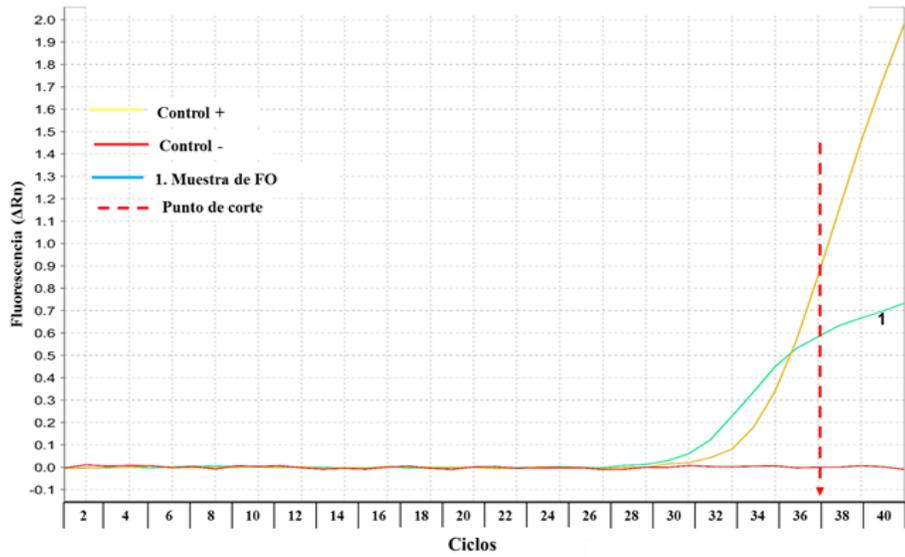
511 Cuadro 1. Condiciones de amplificación para RT-PCR en tiempo real, en un  
512 volumen de 25 µl.

Proceso	Temperatura y tiempo
Transcripción reversa	45°C por 10 minutos
Activación del inhibidor Taq	95°C por 10 minutos
Amplificación (40 ciclos)	95°C por 15 segundos
	60°C por 1 minuto, 10 segundos

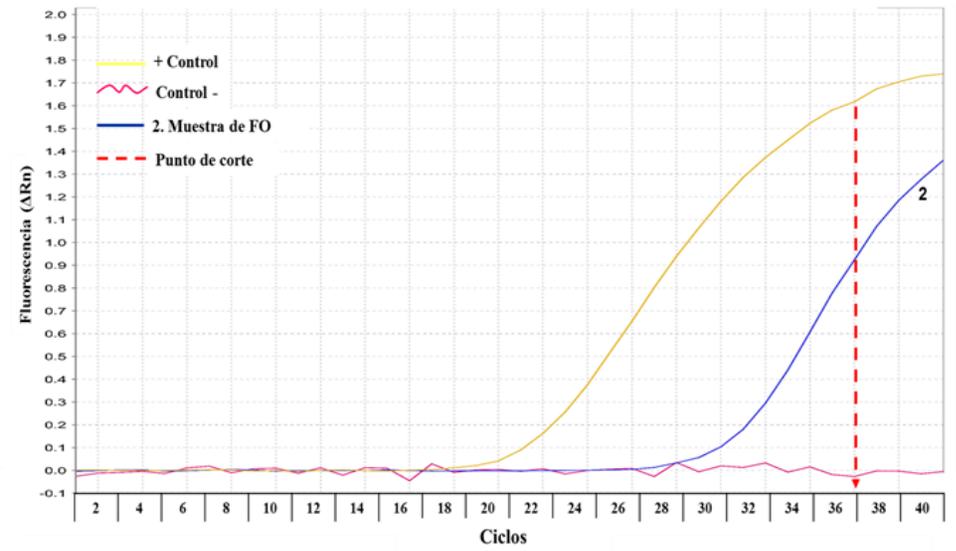


513 Figura 1. Porcentaje por grupo de animales muestreados, que resultaron positivos  
514 (IgG) y negativos a la prueba de ELISA (IDEXX HerdChek® X3 PRRS).

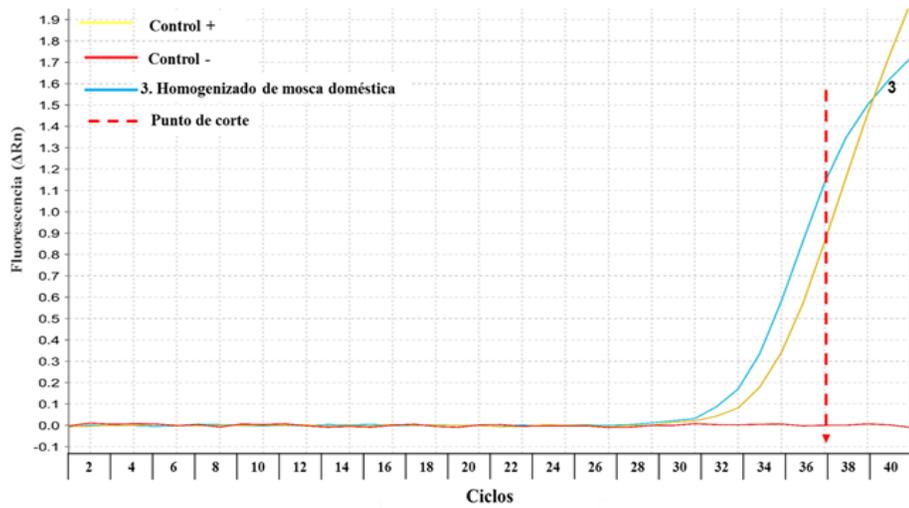
a) 1ª Amplificación por RT-PCR en tiempo real en una muestra de FO



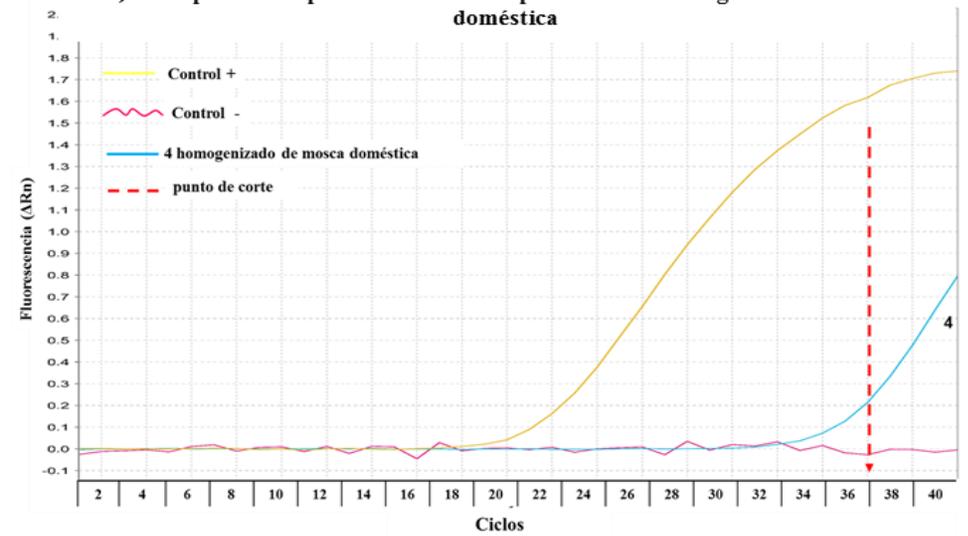
b) 2ª Amplificación por RT-PCR en tiempo real en una muestra de FO



a) 1ª Amplificación por RT-PCR en tiempo real en un homogenizado de mosca doméstica



b) 2ª Amplificación por RT-PCR en tiempo real en un homogenizado de mosca doméstica



516 Figura 2. Amplificación del gen ORF 7 por RT-PCR en tiempo real de Fluidos Orales  
517 (a y b) de cerdos y homogenizados de mosca doméstica (c y d). El punto de corte,  
518 esta representado por una línea roja punteada. Los controles positivos y negativos  
519 de los amplificadas están representados en cada figura (líneas amarillas y rojas  
520 respectivamente). Los números del 1 y 2 corresponden a una muestra de Fluido  
521 Oral de cerdos y los números 3 y 4 corresponden a una muestra de homogenizados  
522 de mosca doméstica. El eje "X" corresponde a los ciclos de amplificación, y el eje  
523 "Y" es la producción de fluorescencia.