



Universidad Nacional
SAN LUIS GONZAGA



[Atribución 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0)

Esta licencia permite que otros distribuyan, mezclen, adapten y construyan sobre su trabajo, incluso comercialmente, siempre que le reconozcan la creación original. Esta es la licencia más complaciente que se ofrece. Recomendado para la máxima difusión y uso de materiales con licencia.

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>



UNIVERSIDAD NACIONAL "SAN LUIS GONZAGA DE ICA"
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA.



TESIS

"ESTUDIO DE VACUNA VIVA Y MUERTA ELABORADA EN CULTIVO CELULAR CONTRA PRRSV SOBRE INMUNOLOGÍA CELULAR Y HUMORAL EN CERDAS PRIMERIZAS"

LINEA DE INVESTIGACION:

PRODUCCION ANIMAL

EJECUTADO POR:

ANNY LIZ HERNÁNDEZ ARIAS

ASESORIA:

AGUSTIN GUERRERO CANELO

CHINCHA – PERU

2020

DEDICATORIA:

En primer lugar, agradecer a Dios porque me permite tener a mi familia con buena salud en estos tiempos tan difíciles. A mis viejitos “Héctor y Ruty” que, en su humildad, su calma y con mucha sabiduría me han enseñado apreciar cada cosa que viene y ah disfrutar también de lo básico haciéndome crecer en fortaleza.

A mis 4 hermanos “Melissa, Percy, Laura y Roció” quienes desde pequeña me decían: estudia tienes que ser una mujer de bien y una gran profesional, siempre en ese orden; primero hacer el bien. A quien tuve como asesor, maestro y amigo; el Dr. Juan de Dios Sandoval, gracias por su apoyo incondicional; ¡trabajo cumplido mi doc!!! Dios lo tenga en su gloria.

Y a mis amuletos de la buena suerte; mi hermanito de 4 patas “Pillin” y mi hijita “Sabby”, fuente de inspiración para salvar vidas.

¡¡¡POR USTEDES Y PARA USTEDES!!!

AGRADECIMIENTO:

Agradezco a mi asesor, el Dr. Agustín Guerrero por su ayuda y consejos, al Dr. Manuel AlbetisApolaya quien, con sus amplios conocimientos en el campo de la porcicultura, me brindó su apoyo constante durante la ejecución de mi proyecto de tesis y al Laboratorio FARVET quien me facilito sus instalaciones y equipos.

¡¡A TODOS, GRACIAS!!

INDICE

DEDICATORIA:.....	1
AGRADECIMIENTO:.....	2
INDICE TABLAS	6
INDICE GRAFICOS	7
INDICE DE ANEXOS	8
RESUMEN	9
SUMMARY	11
I INTRODUCCIÓN	12
II REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1. Antecedentes	13
2.2. Marco teórico	18
2.2.1. Fallas reproductivas porcinas	18
2.2.2. Síndrome Reproductivo Porcino (SMEIDI)	18
2.2.3. Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS).....	19
2.2.4. Control del PRRS en granjas porcinas	22
2.2.5. Beneficios de la vacunación contra PRRS	25
2.2.6. El uso de vacuna para el control de PRRS.....	25
2.2.7. Vacunación para aclimatar a las cerdas de reposición.....	26
III Materiales y Métodos	28
3.1. Localización (Departamento, provincia) y ambiente.....	28

3.2. Instalaciones utilizadas	28
3.3. Materiales y Equipo.....	28
3.4. Tipo de investigación.....	29
3.5. Metodología de la investigación	29
3.5.3. Alimentación:	29
3.5.4. Manejo de la alimentación y fedd back (1 Grupo de 20 chanchillas)	
30	
3.5.5. Manejo con vacunas vivas y muertas (2 grupo de chanchillas).....	30
3.5.6. De la Citometría de flujo para determinar subpoblaciones linfocitarias	
30	
3.6. Tratamientos	31
Tabla 1 de contingencia para los tratamientos	31
3.7. Variables en estudio.....	32
3.8. Diseño experimental.....	33
3.9. Análisis estadísticos	34
IV RESULTADOS.....	34
4.1. Resultados de PCR-TR, positivo a PRRSV (ORF6) de la granja porcina	
de Lurín.....	34
Tabla 4 Resultados de PCR-TR, positivo a PRRSV (ORF6) de la granja porcina	
de Lurín	34
4.2. Medias de títulos de anticuerpos antes y después de la vacunación contra	
PRRS en cerdas primerizas.....	35

4.3. Parámetros reproductivos después de la vacunación contra PRRS en cerdas primerizas vs no vacunadas.....	37
4.4. Respuesta inmune celular inducida por la vacuna elaborada en cultivo celular	39
4.4.1.	
Niveles totales de linfocitos T cooperadores (CD4+), citotóxicos (CD8+) y d	
bles positivos (CD4+CD8+) al inicio del experimento	39
V DISCUSION	44
VI CONCLUSIONES	46
VII RECOMENDACIÓN.....	48
VIII BIBLIOGRAFÍA.....	49
IX ANEXOS	54

INDICE TABLAS

	Pag
Tabla 1 de contingencia para los tratamientos.....	32
Tabla2 Variables independientes y dependientes.....	32
Tabla 3 De operacionalización de variables.....	33
Tabla 4 GranjaporcinadeLurín.....	34
.....	34
estadísticas de muestras emparejadas de medias de títulos de	
Tabla 5 anticuerpos antes y después de la vacunación contra PRRS en	
cerdas primerizas.....	35
Tabla 6 parámetros reproductivos después de la vacunación contra	
PRRS en cerdas primerizas vs no vacunadas.....	37
resumen de parámetros reproductivos después de la	
Tabla 7 Vacunación contra PRRS en cerdas primerizas vs no	
vacunadas.....	37
Valores en porcentajes del total de leucocitos por muestra de	
Tabla 8 poblaciones CD21+ (Linfocitos B) y monocitos. El promedio y La	
desviación estándar fue determinado por el programa FLOWJo	
10.7.1 (software de análisis de Citometría flujo).....	40

INDICE GRAFICOS

Gráfico 1 Citometría de flujo para determinar subpoblaciones linfocitaria...	222
Gráfico 2 Estadísticas de muestras emparejadas de medias de títulos de anticuerpos antes y después de la vacunación contra PRRS en cerdas primerizas.	366
Gráfico 3 parámetros reproductivos después de la vacunación contra PRRS en cerdas primerizas vs no vacunadas.	38
Gráfico 4: Niveles de linfocitos T cooperadores (CD3+CD4+), linfocitos T citotóxicos (CD3+CD8+) y linfocitos doble positivos (CD3+CD4+CD8+) por muestra.	400
Gráfico 5 Niveles de linfocitos B (CD21+) y monocitos por muestra.	411
Gráfico 6 Comparación estadística y significancia de cerdos “tratados” vs “no tratados”. Por niveles de linfocitos T cooperadores (CD3+CD4+), linfocitos T citotóxicos (CD3+CD8+), linfocitos doble positivos (CD3+CD4+CD8+), linfocitos B (CD21+) y monocitos por grupo n=5.	422

INDICE DE ANEXOS

	Pag.
Anexo 1 resultados PSRRV(ORF6) a la prueba de PCR-TR.....	54
Anexo 2 resultados estadísticos de los parámetros reproductivos de las cerdas primerizas vacunas vs las no vacunadas.....	55
Anexo 3 resultados a la prueba de T student para muestras emparejadas.....	55
Anexo 4 prueba de homogeneidad de varianzas para los grupos primerizas vacunadas vs no vacunadas.....	56
Anexo 5 prueba de ANOVA para grupos de primerizas vacunadas vs no vacunadas.....	57
Anexo 6 fotos de la obtención de muestras para el trabajo experimental	58

RESUMEN

INTRODUCCION: la porcicultura en el Perú en la actualidad viene atravesando por una crisis sanitaria, muchas enfermedades como Circovirus Porcino, Parvovirus, Peste Clásica Porcina, PRRS, etcviene produciendo pérdidas económicas. El PRRS es la que más problemas ocasiona ya que produce cuadros neumonías y fallas reproductivas especialmente en cerdas rimeriza, trayendo consigo perdidas hasta un 25%. El uso de vacunas importadas para controlar esta enfermedad no se recomienda ya que este viere se recombina fácilmente y puede agravar el problema con la aparición de más variantes, por lo que se usa la reinfectina en chanchillas para sero convertirlas, de acuerdo a estudios esta técnica no es muy efectiva, Por lo que propones en este estudio el uso de autovacunas contra PRRS para su control en cerdas primerizas

OBJETIVO: Evaluar el uso de una vacuna viva y muerta, elaborado en cultivo celular, contra PRRSV para mejorar la inmunología celular y humoral en cerdas primerizas.

METODOS: El trabajo se realizó en una granja tecnificada ubicada en el distrito de Lurín de la Provincia de Lima-Perú. El tipo estudio correspondió Investigación Aplicativa – Experimental –Transversal – Descriptivo. Se evaluaron 40 cerdas primerizas divididas en dos grupos. Grupo control (20n). Grupo autovacuna (20n), el grupo control fueron cerdas que se le infectaba mediante la técnica de la infectina y el otro grupo recibieron autovacuna para seroconvertirlas. Los grupos fueron evaluados para determinar anticuerpos para PRRS mediante la técnica de ELISA y para determinar subpoblaciones linfocitarias se usó la técnica de

citometría de flujo; además se evaluaron parámetros reproductivos de las cerdas primerizas tratadas. Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) para medidas cuantitativas, con un nivel de significancia del 5%.

RESULTADO: La granja a la prueba de PCR-TR resultó positivo para PRRSV con la cepa americana. Después de 15 días de terminado el tratamiento, los títulos de anticuerpos fueron de la siguiente manera, grupo no vacunado 0,13855 vs 0,21980 grupo vacunados, encontrándose diferencia significativa entre los grupos $P < 0.05$. Los parámetros reproductivos después de la vacunación contra PRRS en cerdas primerizas vs no vacunadas fueron de la siguiente manera: nacidos vivos (LNV), lechones nacidos muertos (LNM), momias y lechones nacidos totales (LNT), las cerdas primerizas no vacunadas tuvieron LNV= 10,75, LNM= 1.57, Momias= 1.25 y LNT= 11.55; las cerdas primerizas tuvieron LNV= 12,505, LNM= 1.00, Momias= 1.00 y LNT= 12.80. al análisis estadístico los parámetros LNV y LNT tuvieron diferencia significativas $P < 0.05$, Las cerdas vacunadas cuando se les realizó prueba de citometría fue capaz de estimular el incremento de linfocitos TCD8 (protectores) a diferencia de las no vacunadas

CONCLUSION: El uso de la autovacuna incremento los títulos de anticuerpos, activo el sistema los linfocitos TCD8 que los protectores específicos para infecciones virales y por último los parámetros reproductivos de lechones nacidos vivos y totales tuvieron una diferencia significativa mejor cuando se comparó con cerdas primerizas no vacunadas.

Palabras claves: PRRS, ELISA, Autovacunas, Citometría de flujo, Subpoblaciones linfocitarias

SUMMARY

INTRODUCTION: pig farming in Peru is currently going through a health crisis, many diseases such as Porcine Circovirus, Parvovirus, Classical Swine Plague, PRRS, etc. have been producing economic losses. PRRS is the one that causes the most problems since it produces pneumonia and reproductive failure, especially in rimerized sows, causing losses of up to 25%. The use of imported vaccines to control this disease is not recommended since it recombines easily and can aggravate the problem with the appearance of more variants, so reinfectin is used in pigs to sero convert them. It is very effective, which is why you propose in this study the use of autovaccines against PRRS for its control in gilts.

OBJECTIVE: To evaluate the use of a live and dead vaccine, prepared in cell culture, against PRRSV to improve cellular and humoral immunology in gilts.

METHODS: The work was carried out in a technified farm located in the Lurín district of the Lima-Peru Province. The type of study corresponded to Applicative Research - Experimental - Cross-Sectional - Descriptive. 40 gilts divided into two groups were evaluated. Control group (20n). Autovaccine group (20n), the control group were sows that were infected by the infectin technique and the other group received autovaccine to seroconvert them. The groups were evaluated to determine antibodies to PRRS by means of the ELISA technique and to determine lymphocyte subpopulations the flow cytometry technique was used; In addition, reproductive parameters of the treated gilts were evaluated. A completely randomized design (DCA) was used for quantitative measures, with a significance level of 5%.

RESULT: The farm to the PCR-TR test was positive for PRRSV with the American strain. After 15 days of finishing the treatment, the antibody titers were as follows,

unvaccinated group 0.13855 vs 0.21980 vaccinated group, finding a significant difference between the groups $P < 0.05$. The reproductive parameters after vaccination against PRRS in gilts vs unvaccinated sows were as follows: live births (LNV), stillborn piglets (LNM), mummies and total born piglets (LNT), unvaccinated gilts had LNV = 10.75, LNM = 1.57, Mummies = 1.25 and LNT = 11.55; gilts had LNV = 12.505, LNM = 1.00, Mummies = 1.00 and LNT = 12.80. At statistical analysis, the LNV and LNT parameters had significant differences $P < 0.05$, the vaccinated sows when they underwent a cytometry test were able to stimulate the increase of TCD8 lymphocytes (protectors) unlike the unvaccinated

CONCLUSION: The use of the autovaccine increased the antibody titers, activated the TCD8 lymphocyte system, which were the specific protectors for viral infections, and finally, the reproductive parameters of live and total born piglets had a significantly better difference when compared to non-gilts vaccinated.

Keywords: PRRS, ELISA, Autovaccines, Flow cytometry, Lymphocyte subpopulations

I INTRODUCCIÓN

La porcicultura en del Perú en la actualidad viene pasando por una crisis sanitaria, se viene presentando muchas enfermedades que producen muchas pérdidas

económicas, estas enfermedades son; el Circovirus Porcino, Parvovirus, Peste Clásica Porcina, PRRS, etc., además de producir alta morbilidad y mortalidad principalmente en los lechones en la etapa de recría, produce muchas fallas reproductivas, dentro de las cuales tenemos, abortos, repeticiones de celo, infertilidad. Una de esa enfermedad que viene ocasionando mayores problemas es el Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS)

El virus del PRRS, tiene una capacidad de recombinación con otros serotipos y puede aparecer otro nuevo serotipo, iniciando otro brote de la enfermedad, por lo que no se recomienda, el ingreso de animales extraños, semen y vacunas. Dentro del manejo existe la reposición de primerizas para reemplazar a las cerdas descartadas y para ingresar a una granja con PRRS, debe pasar por una cuarentena donde se le seroconvierte a la enfermedad con un sistema llamado infectina. que consiste en proporcionar, lechones muertos, placentas, momificados, heces para que se infecten y formen anticuerpos contra la enfermedad y así recién entrar a la etapa de gestación, existe otra técnica que es la de vacunar y es la más efectiva, pero como la gran mayoría de vacunas son importadas ,SENASA no lo recomienda, por lo que en este trabajo de investigación vamos evaluar el uso de la vacunación cepa regional, en cultivo celular y aplicar a las primerizas, con doble dosis; tanto viva y muerta y evaluar su respuesta celular y humoral comparado con la infectiva.

II REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Antecedentes

Antecedente internacional

Alexopouloset al.(1)Realizaron un estudio con la finalidad de evaluar una granja que estaba infectada por el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS), en forma endémica, para determinar cómo era el rendimiento reproductivo de las cerdas después de su vacunación con una vacuna atenuada con PRRS. La granja era de flujo continuo un historial de infección por el virus PRRS endémico, utilizaron un total de 200 cerdas entre primerizas y adultas. Se dividieron en 2 grupos de 100 animales. El primer grupo fue utilizado como controles no tratados, mientras que los animales del segundo grupo se vacunaron contra PRRS virus usando vacuna atenuada contra PRRS atenuada (Porcilis, Intervet International, Países Bajos) basado en una cepa Europea. Toda la salud y los parámetros reproductivos se registraron desde el momento de la vacunación hasta el destete. No se observaron reacciones sistémicas o locales adversas o efectos secundarios relacionados con la vacunación. En comparación con los controles, las cerdas vacunadas mostraron una tasa de partos significativamente mejorada (89% versus 78%) y una tendencia a menos retornos al estro, particularmente a intervalos irregulares. Menos cerdas parieron prematuramente y mostraron síndrome de disgalactia posparto, pero nacieron y destetaron más cerdos vivos en cada camada después de la vacunación. Se concluyó que la vacunación de cerdas con Porcilis PRRS vacuna atenuada en granjas con infección por PRRSV endémica tiene efectos beneficiosos sobre su salud y fertilidad.

(Jeong, y otros (2)en el 2016 China, con el objetivo de evaluar realizó un estudio en campo, para determinar el rendimiento reproductivo de las cerdas después de la vacunación con un porcino síndrome reproductivo y respiratorio (PRRS) con una vacuna subunitaria (PRRSFREE PRRS subunidad de vacuna, ReberGenética,

Taiwán, República de China). El estudio se realizó en tres granjas con infecciones endémicas con ambos virus PRRS (PRRSV) -1 y PRRSV-2, algo que es común en la mayoría de las granjas coreanas. Las cerdas preñadas fueron inmunizadas por vía intramuscular con 2,0 ml de la vacuna de subunidad a los 58 y 79 días de gestación (ocho y cinco semanas antes del parto) de acuerdo con la recomendación del fabricante. La vacunación no produjo reacción adversa. Las cerdas vacunadas mostraron una mejora significativa, en el rendimiento reproductivo (reducción de los abortos) y las características de la camada (aumento de cerdos destetados) en comparación con las cerdas no vacunadas. Las cerdas vacunadas tuvieron una proporción significativamente mayor ($P < 0.05$) de muestra ELISA de PRRSV / positivo y el número de células secretoras de interferón- γ específicas de PRRSV en comparación con el grupo de control no vacunado. Los resultados de este estudio demuestran que la vacuna de subunidad PRRS puede mejorar el rendimiento reproductivo de las cerdas en granjas con infección endémica por PRRSV.

Antecedente Regional

(Burgara-Estrella, y otros (3) En 2014 en México con el objetivo de examinar la evolución y la posible existencia de recombinaciones intragénicas de cepas de PRRSV en Sonora, México. En este estudio, 142 muestras de suero de granjas ubicadas en Hermosillo (HMO), Cd. Obregón (OBR) y Navojoa (NAV) se secuenciaron de 2002 a 2012. Se analizaron noventa secuencias no redundantes del gen ORF5 para determinar las relaciones temporales y espaciales entre las cepas y la probabilidad de un evento de recombinación. El análisis filogenético mostró 30 cepas agrupadas en ocho grupos; 16 cepas estaban estrechamente relacionadas entre las fincas, mientras que 14 no estaban relacionadas. La primera

cepa en este estudio se observó en 2002. Varias granjas se infectaron con una o más cepas, y en la mayoría de las cepas, el virus fue reemplazado por una nueva cepa. El análisis de recombinación sugirió la presencia de cuatro virus como productos de un evento de recombinación; en un caso, un virus cercano relacionado con la vacuna MLV estuvo involucrado como el virus principal. Este trabajo muestra la evolución de PRRSV en el campo, la diseminación viral entre granjas y los posibles eventos de recombinación. Nuestros datos sugieren que el PRRSV en Sonora tiene una naturaleza genética específica en comparación con otros PRRSV.

Antecedente Nacional

Velásquez Vergara, Vega Vilca y Lucho Cerga 2016 (4) en la ciudad de Arequipa-Perú, realizaron un estudio. El objetivo del estudio fue evaluar la presentación del Síndrome Reproductivo Respiratorio Porcino (PRRS) en el tiempo y determinar el efecto que produce sobre las características productivas y reproductivas. Se evaluó el comportamiento productivo de 210 marranas Camborough 22, que parieron entre 2013 y 2015 en una granja porcina de Arequipa Perú. Las características evaluadas fueron el promedio semanal/camada de lechones nacidos (NT), total de lechones nacidos vivos (NV), total de lechones nacidos muertos (NM), peso vivo de los lechones nacidos (PVLN), total de lechones destetados (LD), peso vivo de lechones destetados (PVL70), mortalidad de lechones al destete (MLD), peso vivo de lechones a los 70 días (PVL70) y mortalidad de lechones a los 70 días (ML70). El incremento de los NM superior a los límites normales de las gráficas de control duró 13 semanas, evidenciándose a partir de la semana 95 (cuarta semana octubre 2014) y se prolongó hasta la semana 108 (segunda semana febrero 2015). En el año de la presentación del PRRS, los NM, PVLN y ML70 se incrementaron en 2.3

veces, 6.8% y 13 veces, respectivamente ($p < 0.05$), mientras que el NT, NV, LD, MLD y PVL70 disminuyeron en 16.4, 22.0, 20.5, 44.6 y 11.6%, respectivamente ($p < 0.05$). La menor productividad redujo los ingresos por marrana/año hasta un 35.6%. El PRRS afectó los principales parámetros reproductivos y productivos evaluados hasta los 70 días de edad, generando pérdidas económicas.

2.2. Marco teórico

2.2.1. Fallas reproductivas porcinas

En las cerdas y en primerizas las fallas reproductivas se pueden clasificar en fallas infecciosas y fallas no infecciosas. Dentro de las principales enfermedades que producen fallas reproductivas tenemos:

- Lechones nacidos muertos
- Lechones momificados
- Retorno al celo largo
- Infertilidad
- Metritis, etc. (5)

2.2.2. Síndrome Reproductivo Porcino (SMEIDI)

Se denomina SMEIDI, a las enfermedades que son producidas por agentes patógenos que son específicos del tracto reproductivo, tales como:

Peste Clásica Porcina (PCP)

Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS)

Circovirus tipo 2 (PCV2)

Parvovirus

Enfermedad de Aujeszky(6)

Estos agentes infecciosos se caracterizan, por los trastornos reproductivos; demora en el retorno al celo, lechones nacidos débiles, momificados, aborto, lechones momificados. (6)

En la actualidad el virus que más problemas reproductivos está el PRRS.

2.2.3. Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS)

El virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV) es un agente etiológico de una epidemia mundial denominada PRRS (7), El virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV) es responsable de los trastornos reproductivos en cerdas y problemas respiratorios en cerdos, y tiene un gran impacto económico. Controlar el PRRSV es, por lo tanto, una prioridad para la industria porcina. La estabilización de una manada, definida como la producción de cerdos PRRSV negativos al destete de cerdas seropositivas, es un método común de control, y se han descrito diferentes protocolos en la literatura para lograr esta estabilización.(8)

2.2.3.1. Virus del PRRS

El PRRSV es un miembro de la familia Arterividae dentro del orden Nidovirales, que también incluye a las familias Coronaviridae y Roniviridae. Constituye el grupo de virus ARN de sentido positivo de hebra única que comparten una estrategia de replicación transcripción distintiva (9). El genoma del PRRSV tiene 14,9kb de longitud y este expresa una gama de proteínas estructurales y accesorias con un mecanismo de transcripción distinta (10).

El genoma de PRRSV contiene más de 10 marcos de lectura abiertos (ORF). ORF1a y ORF1b representan más de dos tercios del genoma viral y codifican proteínas no estructurales que son necesarias para la replicación viral, mientras que los ORF 2-7 codifican proteínas estructurales.(11). Hay dos genotipos de PRRSV bien reconocidos: Tipo 1,

o de tipo europeo (prototipo Lelystad) y Tipo 2, o de tipo norteamericano (prototipo VR-2332), (12)

2.2.3.2. Patología y fallas reproductivas en las cerdas infectadas por PRRS

El efecto patológico principal que causa en la cerda, el virus PRRS, es que este puede migrar a través de la placenta de las cerdas preñadas, especialmente durante el último trimestre de gestación (13). Es importante reconocer esta migración transplacentaria producto de la apoptosis inducida por PRRSV en la placenta y se produce el aborto en el último periodo de gestación; esto causa mortalidad del feto y un incremento de los lechones nacidos muertos(14).

2.2.3.3. Repercusión económica del PRRS en granjas porcina.

Unos de los estudios donde se demuestra cómo repercute el PRRS en la producción porcina, fue demostrado por comunidad científica en el 2005, en donde se determinó pérdidas de \$560 millones de dólares anuales (15), en otros trabajos se determinó que el PRRS en EUA produce una pérdida de \$664 millones de dólares, y lo más importante que las pérdidas curren más en granjas de reproductoras, uno de los factores es la alta población en granjas esto permite un recirculación del virus (16). Cuando se realizó un estudio para determinar el impacto del virus del PRRS puede determinar el impacto económico se concluyó que existía una pérdida que \$ 9 por cerdo en la fase de cría y casi \$ 8 por cerdo en la fase de finalización(16). En el Perú se reporta una pérdida de la productividad hasta un 35.6%, siendo la etapa donde existe mayor pérdida económica, en los lechones a los 70 días de edad(4).

2.2.3.4. Diagnostico

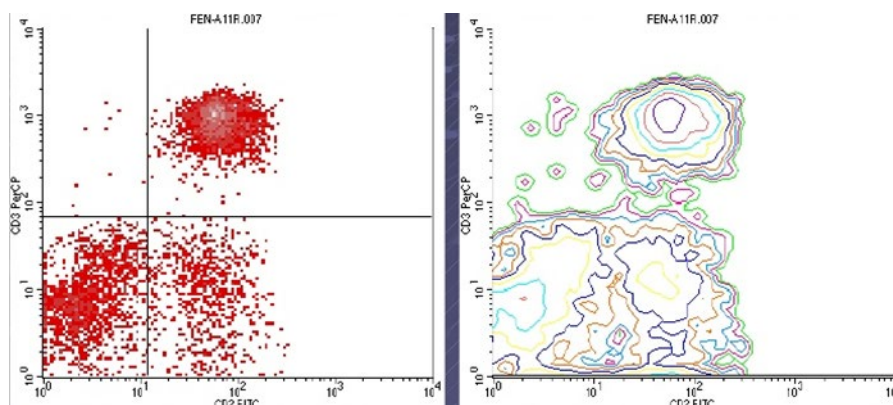
Test de anticuerpo:

Para detectar anticuerpo contra el virus del PRRS se utilizan diferentes técnicas, entre ellos tenemos: ELISA, IPMA, IFA y test de seroneutralización. La prueba más común a nivel mundial es la prueba de ELISA. El uso de IDEXX ELISA es una prueba comercial para el Dx del PRRS, es la prueba que más se utiliza en la granja a nivel mundial. Esta prueba ha demostrado su alta sensibilidad y especificidad; además su automatización permite que se realicen altas muestras en un tiempo corto. Hay que tener en cuenta que a veces se puede obtener FALSOS POSITIVOS en condiciones de campo, es por esta razón que el análisis con esta prueba se debe aplicar a nivel de explotación o grupal. La existencia de anticuerpos contra el virus del PRRS con esta prueba se determina midiendo la ratio s/p (muestra de suero/control positivo). Una s/p de 0,4 ó mayor, se considera positiva a infección por PRRS(17).

Estudio de las subpoblaciones linfocitarias por citometría de flujo:

Es una técnica que se basa en la utilización de múltiples fluorescencias y de la luz de células o partículas microscópicas, alineadas mediante una corriente líquida laminar. En lo que respecta al estudio de la inmunología, que es de gran ayuda para entender un poco más el virus del PRRS, es necesario recordar las dos ramas del sistema inmunológico En base a esto, se puede hacer un estudio de las subpoblaciones linfocitarias para determinar la eficiencia de una vacuna (18).

Gráfico 1 Citometría de flujo para determinar subpoblaciones linfocitaria



2.2.4. Control del PRRS en granjas porcinas

La investigación de la prevalencia del virus PRRS en 100 casos clínicos de cerdas con fetos abortados y lechones nacidos muertos en España encontró que el virus PRRS se podía detectar en solo el 9,0% de las muestras (19). En la práctica, se han utilizado muchos tipos de estrategias de manejo que incluyen la aclimatación, el manejo de grupos de recría y la vacunación con la vacuna de virus muertos y / o la vacuna de virus vivos modificados (MLV) para controlar los signos clínicos de la infección por el virus PRRS(20).

2.2.4.1. Tipos de vacunas para el control del PRRS

Las vacunas son el método más eficaz para poder controlar enfermedades infecciosas. Su protección puede en algunos casos hasta el 100, en otras 90%. Las vacunas son biológicos muy seguro y las reacciones que puede producir son leves y transitorias. Otra cosa que se puede mencionar es que la vacuna es un buen método para erradicar una enfermedad o reducir drásticamente su incidencia.(11).

Vacunación PRRS

Cuando se usa un determinado protocolo de vacuna, es importante usar la vacuna que corresponde y sobre todo en el momento adecuado. Los beneficios de la vacunación, se puede decir que son dos: primero sería el beneficio directo: mejora en la salud y el rendimiento(21),

Vacunas vivas atenuadas.

Las vacunas vivas atenuadas, son aquellas en donde se utiliza el agente infeccioso vivo y homólogo al que produce la enfermedad, donde la virulencia ha sido atenuada, de modo que no produce efectos secundarios en el animal, pero si produce una inmunidad por mucho tiempo frente al agente patógeno de la misma enfermedad en granja endémicas(22).

El sistema de atenuación más utilizado en la actualidad se basa en realizar un gran número de pases o replicaciones cuando se trata de un virus en líneas celulares, de esta manera el virus pierde su patogenicidad, pero si tiene la capacidad de replicarse en el huésped y puede activar el sistema inmune del animal. Tiene capacidad de estimular CD4+ y CD8+.(23).

El inconveniente es que este tipo de virus atenuado puede revertir a su forma patógena y tener sumo cuidado con la cadena de frío para que no pierda su potencia antigénica. Las vacunas vivas inducen una respuesta inmunitaria mayor a la de las vacunas muertas, tanto a nivel humoral como celular(23).

Vacunas muertas o inactivadas

Vacunas muertas o inactivadas, son aquellas que están formadas por virus inactivados ya sea por medio físico o químico. Esta tiene las ventajas que son más estables y seguras, pero no tienen una respuesta inmunitaria como cuando la vacuna es viva, especialmente la ligada a linfocitos T CD4+ con producción de anticuerpos., estas no requieren de refrigeración por lo que se puede movilizar sin problemas, se tiene que usar varias dosis de recuerdo, para manejar este problema se añaden adyuvantes que potencia su respuesta inmune(23).

Autovacunas

Son aquellas vacunas que se preparan a partir de cepas que son aislados de los propios animales enfermos para ser aplicados a los animales de la propia explotación o en un área geográfica concreta. Se usa cuando no existe una vacuna en el comercio o en todo caso se trata de una cepa con diferencia antigénica de serotipo y los de las vacunas comerciales, se debe utilizar hasta que los animales se estabilizan sanitariamente (24).

Para producir esta autovacuna la muestra se toma del animal enfermo, luego se identifica, para luego cultivarlo en cultivo especial; posteriormente se hace la cosecha, se le añade adyuvante, como el hidróxido de aluminio u otro de tipo oleoso. Al final se le inactiva con formol, para último se le aplica un tratamiento térmico(23).

2.2.5. Beneficios de la vacunación contra PRRS

Existen muchos estudios que se han realizado basados en el campo, que viene demostrando que una buena vacuna contra PRRS ofrece beneficios a los productores porcinos:

Beneficio Directo: Los cerdos que se infectan con PRRSV reportan menos ganancias, una alta tasa de mortalidad y morbilidad, produciendo grandes pérdidas económicas aproximadamente se calcula que existe una pérdida de \$ 4.32 por cerdo. Los estudios demuestran que usando una buena vacuna contra PRRS se lograra: Protección cruzada contra alguna variedad de cepa de campo, que reduzca la mortalidad y que se logre recuperar la ganancia media diaria(15).

Beneficio indirecto. El uso de una buena vacuna además de reducir la enfermedad en forma clínica, el beneficio indirecto es reducir la transmisión y diseminación de la enfermedad(15).

2.2.6. El uso de vacuna para el control de PRRS

Cuando en una granja se presenta el problema de PRRS o un brote de Influenza la pregunta es “¿Qué intervenciones puedo implementar para minimizar las pérdidas de producción?”. Más del 30% de pérdida del costo total se está produciendo. Entonces lo más importante es regresar inmediatamente a lo que era antes del proceso epidémico.(1)

El Dr. Daniel Linhares²⁰¹⁵ (25), en la Universidad de Minnesota ha evaluado el impacto del uso de dos protocolos de exposición/homogenización. Las granjas que utilizaron el uso de vacuna viva atenuada volvieron rápidamente a su producción anterior y tuvieron la mitad de las pérdidas totales en cerdos destetados, en comparación con las granjas que utilizan la inoculación de virus vivo.(25).

En el caso de la granja es importante minimizar las pérdidas de producción ya que esto lo llevaría a cerrar la granja por problemas económicos, como ha ocurrido con muchas granjas. La pérdida de ganancia es de 15 soles por cerdo (el costo incluye perdido de rendimiento y el costo de medicación) y la pérdida se debe más que todo a los menos kilos de carne por cerdo. La autovacuna con virus vivo atenuado puede ser una herramienta importante para ayudar que la granja se encarrile y vuelva a sus niveles de producción deseada después de un problema de pandemia por PRRSV (23).

Cuando se vacuna contra PRRS según los estudios realizados, indican que los cerdos en solo 17 días se encuentran menos aerosoles positivos y a los 30 días ya no se encuentran aerosoles positivos, comparado con los no vacunados(26).

Según MateuDiaz, 2008(27) “En general mediante la vacunación es el método más rápido y fácil para estabilizar una granja”

2.2.7. Vacunación para aclimatar a las cerdas de reposición

La aclimatación de cerdas de reposición libres de PRRSV es mejor mediante la vacunación. Por esto debe considerarse siempre una primera vacunación con una vacuna viva y un análisis serológico de las núlparas a los 14 días para ver si han sido correctamente vacunadas. Para determinar una adecuada aclimatación es importante también usar como estrategia muestras de fluidos orales por efectivo conveniente práctico y económico(28). En algunos casos, cuando la presión de infección en la granja de destino es elevada, puede considerarse una revacunación 4 semanas después de la primera y al menos 3 semanas antes de la primera inseminación. Si las cerdas de reposición son serológicamente positivas a PRRS debido a una infección previa en su juventud, una dosis única será suficiente (de nuevo con vacuna atenuada para asegurar una inmunidad elevada). La primera inmunización debe realizarse siempre con una vacuna viva(29).

2.2.7.1. Recordatorios para cerdas

La vacunación de recuerdo puede hacerse con vacuna viva o inactivada. En ambos casos los protocolos más habituales tienen en cuenta 3 (en algunos casos 4) vacunaciones/año, normalmente con aplicación en sábana. Para la selección de las vacunas, debe considerarse el propio riesgo de infección. Cuando la presión de infección es poco elevada, una vacunación de refuerzo con vacuna inactivada es una posibilidad a valorar si uno no quiere introducir un virus vivo en sus animales(30).

III Materiales y Métodos

3.1. Localización (Departamento, provincia) y ambiente.

El trabajo se realizó en el distrito de Lurín, provincia de Lima-Perú, perteneciente al Sr Lino Palomino F en una granja porcina comercial, que tiene como población 120 madres híbridas, destinadas como reproductoras. La granja se encuentra localizada en el Centro Ganadero "Sumac Pacha". Ver Anexo 1. Las muestras para PCR-TR, suero para ELISA contra PRRS y sangre entera para hacer pruebas de Citometría de flujo, fueron trasladadas al laboratorio FARVET, localizado en la ciudad de Chincha.

3.2. Instalaciones utilizadas

- ✓ Corrales 3 x 11mt. para chanchillas
- ✓ Comederos Lineales
- ✓ Jaulas de maternidad de 2.40 x 75 cm.
- ✓ Módulos de maternidad para parto

3.3. Materiales y Equipo

- ✓ Bebederos
- ✓ Sujetadores
- ✓ Jeringas
- ✓ Tubos de Ensayos
- ✓ Kit de Elisa
- ✓ Citometría de flujo
- ✓ PCR-TR
- ✓ Cooler
- ✓ Botas
- ✓ Cámaras Fotográficas

3.4. Tipo de investigación

Investigación Aplicativa – Experimental – Transversal – Descriptivo.

3.5. Metodología de la investigación

3.5.1. Población y muestra

Determinación del Universo (Población)

La población estuvo conformada por 40 cerdas híbridas primerizas, que son usadas como madres reproductoras para producir cerdos para carne, de una granja localizada en el Parque porcino “Sumac Pacha” del Distrito de Lurín-Lima.

Selección de muestra

Tamaño de la muestra para dos medias independientes:

Riesgo Alfa	0.05
Tipo de contraste	Bilateral
Riesgo Beta	0.02
Razón entre el número de sujetos del grupo 1 Respecto del grupo 2	1
Desviación estándar común	2,1
Diferencia mínima a detectar	2
Proporción prevista de pérdida de seguimiento	0.1

.n = (Grupo 1=20 y Grupo2=20)

3.5.2. Animales:

Los animales que se usarán fueron 40 chanchillas divididos en dos grupos, 20 en cada grupo, grupo control y grupo tratamiento. Estos animales fueron destinados como reemplazo de futuras madres.

3.5.3. Alimentación:

Estas primerizas a partir de los 5 meses de edad recibirán alimento de crecimiento a razón de 3.5 kg por animal. La alimentación consiste en maíz,

soya, harina de pescado, afrecho, carbonato de calcio fosfato mono dicalcico, etc.

3.5.4. Manejo de la alimentación y feed back (1 Grupo de 20 chanchillas)

Las primerizas recibieron alimentación dos veces al día a razón de 3.5kg por cerdas, verificando su condición corporal hasta que logren el peso promedio de 135kg de peso vivo, para su posterior servicio. Ellas recibieron dentro del manejo de aclimatación el programa de feed back, que consiste en alimentarlos con residuos de placenta, fetos y lechones muertos. Antes de empezar con las pruebas se realizó un PCR-TR para garantizar que hayan estado infectados con PRRSV.)

3.5.5. Manejo con vacunas vivas y muertas (2 grupo de chanchillas)

Se tomo muestras de sangre para monitoreo antes de utilizar las vacunas

1era Dosis de vacuna viva:

Antes de aplicar la primera dosis se obtuvo muestra de sangre para enviar al laboratorio y determinar los títulos de anticuerpos y así determinar títulos antes del inicio del trabajo.

2da dosis de vacuna muerta:

Para tener activo al sistema de memoria a largo plazo, Se evaluó a los 15 días después de la última aplicación y comparar los títulos de las cerdas primerizas cuando fueron vacunadas vs la no vacunada

3.5.6. De la Citometría de flujo para determinar subpoblaciones linfocitarias

Protocolos empleados

Extracción de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)

Se empleó el protocolo realizado por Cinar et al (2013) con modificaciones.

Brevemente, se colocó cuidadosamente la sangre extraída de cerdos sobre una capa de Histopaque® 1077. El tubo se centrifuga a 400 x g por 30 minutos a temperatura ambiente. Los PBMCslocalizados en la capa leucocitaria fueron retirados y colocados en un tubo de centrífuga con Buffer

fosfato salino de Dulbecco (DPBS). Se lavaron dos veces y se centrifugaron a 250 x g por 10 minutos. Posteriormente se resuspendieron en DPBS + 5% de suero bovino fetal para su caracterización inmunofenotípica.

Inmunofenotipo de PBMCs

Para la caracterización inmunofenotípica de PBMCs, se marcaron directamente con anticuerpos conjugados para antígenos de superficie (PE-Cy®5 anti-CD3e porcino, PE anti-CD4a porcino, FITC anti-CD8a porcino, FITC anti-CD21 porcino, PE anti- monocito/granulocito porcino, todos de SouthernBiotech). Estas células fueron adquiridas en un citómetro de flujo (FACSCanto™ II, BD Biosciences), y el análisis fue ejecutado con el programa FlowJo v. 10.6.2 (BD Biosciences).

3.6. Tratamientos

Tabla 1 de contingencia para los tratamientos						
Tratamientos	Números de animales				Totales	Prom.
		1	2	3.....	20	Yij

Control n=20						
Sin vacunas	Y1	Y2	Y3	Y4		
Tratamiento =20						
Con vacunas	Y5	Y6	Y7	Y8		

3.7. Variables en estudio

Tabla 2 variables independientes y dependientes

VARIABLE INDEPENDIENTE	
Control de PRRS en cerdas primerizas	Vacuna viva y muerta en tejido celular
VARIABLE DEPENDIENTE	
PCR-TR	<ul style="list-style-type: none"> • Positivo • Negativo
Títulos de anticuerpos	<ul style="list-style-type: none"> • Positivo • Negativo
Subpoblaciones linfocitarias	Cantidad de subpoblaciones linfocitarias

Tabla 3. De operacionalización de variables

Variable	Tipo de Variable	Escala de Medición	Definición Conceptual	Definición Operacional	Valor	Unidad
Variable Dependiente						
Control de PRRS cerdas primerizas	Cualitativa	Nominal	Vacunas Vivo y muerta, contra el Síndrome Reproductivo Porcino (PRRS) elaborado en cultivo celular	Vacuna viva y muerta en cultivo celular	ml.	Dosis
Variable Independiente						
PCR TR	Cualitativa	Nominal	Reacción de PCR cuya principal característica es que permite cuantificar la cantidad de ADN o ARN viral	<ul style="list-style-type: none"> • Positivo • Negativo 	Copias /ml	Virus
Títulos de anticuerpos	Cuantitativa	Continua	Determinación de anticuerpos mediante prueba de Elisa	Ratio > 0,4 positivo Ratio < 0,4 Negativo	Ratio	Niveles Anticuerpos
Subpoblaciones linfocitarias	Cuantitativa	Continua	Es el porcentaje de linfocitos CD4, CD28, C4+28 y CK	Cantidad de subpoblaciones linfocitarias	%	Número de células

3.8. Diseño experimental

El diseño que se empleó fue un diseño completamente al azar (DCA)

El Modelo Aditivo Lineal para un DCA

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij}$$

$i = 1, 2, 3, \dots, t \dots \dots$ tratamiento.

$j = 1, 2, 3, \dots, n \dots \dots$ observaciones.

Y_{ij} = La j -ésima observaciones del i -ésimo tratamiento.

μ = Es la media poblacional a estimar a partir de los datos del experimento.

τ_i = Efecto del i -ésimo tratamiento a partir de los datos del experimento.

ϵ_{ij} = Efecto aleatorio de variación.

3.9. Análisis estadísticos

Se utilizó el programa estadístico SPSS versión 18, para obtener ANOVA para un Diseño Completamente al Azar DCA, tablas de media para cada factor y la interacción, la prueba de Levene, gráficos para la interacción y pruebas de separación de medias para cada factor. Los datos para dos muestras independientes van a ser procesados aplicando la prueba de Test de Student, con un nivel de significancia de $P= 0.05$; además se utilizaron gráficos.

IV RESULTADOS

4.1. Resultados de PCR-TR, positivo a PRRSV (ORF6) de la granja porcina de Lurín.

Tabla 4 Resultados de PCR-TR, positivo a PRRSV (ORF6) de la granja porcina de Lurín

#	Cod. LBMG	Tipo de muestra	Descripción	Análisis	Resultado	Cuantificación (copias/ul)/ Tipificación	copias/ml	Analista	
1	97	Tarjeta FTA (fta)	LMS-PCR-044	PCV2(ORF2)	detectado	*	*	Y.S	18/02/2020
2	97	Tarjeta FTA (fta)	LMS-PCR-045	CSFV(Npro)	no detectado	*	*	D.V	19/02/2020
3	97	Tarjeta FTA (fta)	LMS-PCR-046	MycoSpp(16S)	detectado	*	*	Y.S	20/02/2020
4	97	Tarjeta FTA (fta)	LMS-PCR-047	PRRSV(ORF6)	detectado	*	*	Y.S	21/02/2020

En la tabla 1 de los resultados de PCR-TR se observa que la granja es positiva a PRRSV(ORF6) de la cepa americana y por lo tanto la granja tiene problemas reproductivos y respiratorios en sus animales, las cerdas primerizas son las que mayor problema presenta, ya que estas siempre muestran títulos de anticuerpos

bajos al parto y por tal razón las fallas reproductivas son constantes, razón por la que se determinó realizar el presente trabajo, para una buena seroconversión de las primerizas y de esta manera incrementar y disminuir las fallas reproductivas

4.2. Medias de títulos de anticuerpos antes y después de la vacunación contra PRRS en cerdas primerizas.

Tabla 5. Estadísticas de muestras emparejadas de medias de títulos de anticuerpos antes y después de la vacunación contra PRRS en cerdas primerizas.

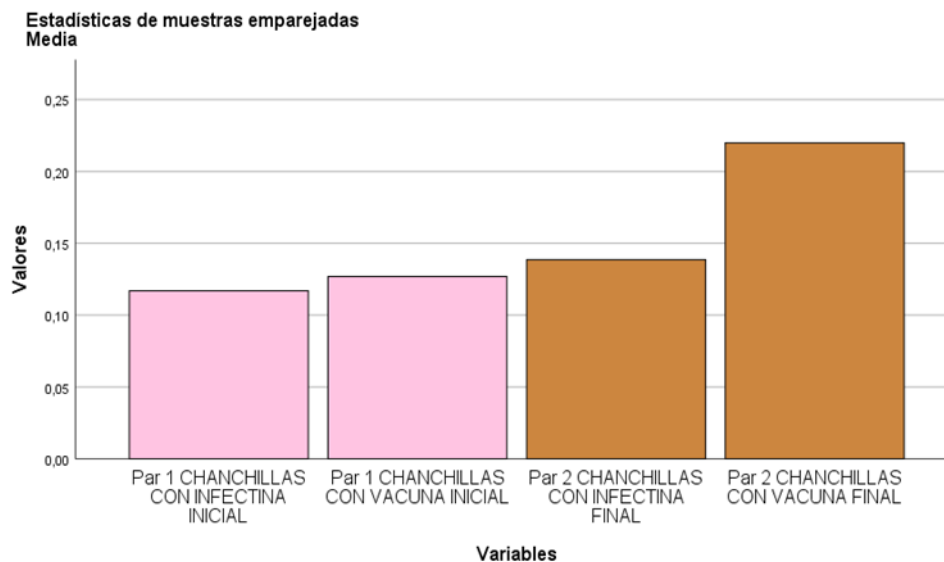
	Media	N	Desv. Desviación	Desv. Error promed
CHANCHILLAS CON INFECTINA INICIAL	,11695 ^a	20	,053066	,011866
CHANCHILLAS CON VACUNA INICIAL	,12690 ^a	20	,032517	,007271
CHANCHILLAS CON INFECTINA FINAL	,13855 ^b	20	,063299	,014154
CHANCHILLAS CON VACUNA FINAL	,21980 ^a	20	,026231	,005865

Nota: a,b letras diferentes, indican promedio diferente, según prueba de T para 2 muestras relacionadas con un nivel de significancia del 5%

En la tabla 4 de estadísticas de muestras emparejadas de medias de título de anticuerpos antes y después de la vacunación contra PRRS en cerdas primerizas, en el par 1 que corresponde al inicio del trabajo experimental, las medias de títulos de anticuerpos para primerizas sin vacuna, pero si se aplica el manejo estándar que consiste en infectar con heces, placenta y lechones muertos, mediante la administración oral a las primerizas y el otro grupo con vacuna viva como primer vacunación y vacuna muerta a los 30 días posterior la segunda dosis de vacuna muerta. Se puede observar que la media para el primer grupo es de 0,11695 vs 0,12690 para el segundo grupo, no existiendo diferencia significativa $P > 0.05$ entre ellos. En el par 2 de las medias de títulos de anticuerpos después a los 15 días después de la última vacuna vacunación, es para el grupo no vacunado 0,13855 vs

0,21980 para el grupo vacunado, encontrándose diferencia significativas entre los grupos $P < 0.05$, esto indica claramente que el uso de las vacunas contra PRRS en cerdas primerizas es la forma más adecuada de inmunizar a este grupo de animales para obtener una mejor respuesta inmunológica y descartar el uso de la infectina recomendada como forma de inmunoseroconvertirlas contra PRRS y así poder servirles y evitar las fallas reproductivas por esta enfermedad. Se puede apreciar en la figura 2 con mayor claridad.

Grafico2 Estadísticas de muestras emparejadas de medias de títulos de anticuerpos antes y después de la vacunación contra PRRS en cerdas primerizas.



4.3. Parámetros reproductivos después de la vacunación contra PRRS en cerdas primerizas vs no vacunadas.

Tabla6 parámetros reproductivos después de la vacunación contra PRRS en cerdas primerizas vs no vacunadas.

		Descriptivos							
		N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
LECHONES NACIDOS VIVOS	INFECTINA	20	10,75	2,173	,486	9,73	11,77	6	14
	VACUNADAS	20	12,50	1,670	,373	11,72	13,28	8	15
	Total	40	11,63	2,108	,333	10,95	12,30	6	15
LECHONES NACIDOS MUERTOS	INFECTINA	7	1,57	,787	,297	,84	2,30	1	3
	VACUNADAS	4	1,00	,000	,000	1,00	1,00	1	1
	Total	11	1,36	,674	,203	,91	1,82	1	3
LECHONES MOMIFICADOS	INFECTINA	4	1,25	,500	,250	,45	2,05	1	2
	VACUNADAS	2	1,00	,000	,000	1,00	1,00	1	1
	Total	6	1,17	,408	,167	,74	1,60	1	2
LECHONES NACIDOS TOTALES	INFECTINA	20	11,55	1,905	,426	10,66	12,44	7	15
	VACUNADAS	20	12,80	1,704	,381	12,00	13,60	8	15
	Total	40	12,18	1,893	,299	11,57	12,78	7	15

Tabla7 resumen de parámetros reproductivos después de la vacunación contra PRRS en cerdas primerizas vs no vacunadas.

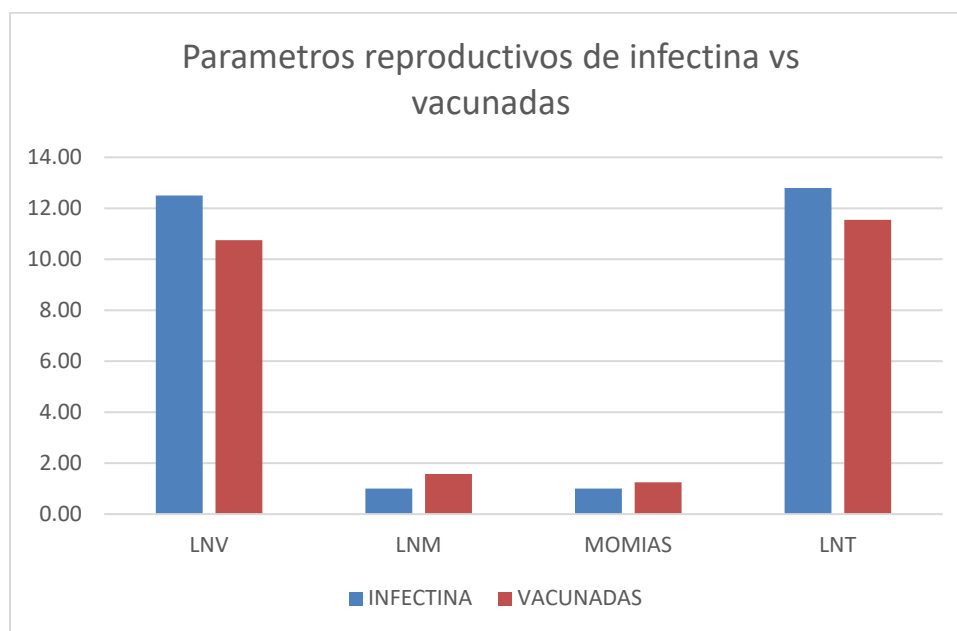
TRATAMIENTOS	PARAMETROS PRODUCTIVOS			
	LNV	LNM	MOMIAS	LNT
VACUNADAS	12.50 ^a	1.00	1.00	12.80 ^a
NO VACUNADAS	10.75 ^b	1.57	1.25	11.55 ^b

Nota: a,b letras diferentes, indican promedio diferente, según prueba de T para 2 muestras relacionadas con un nivel de significancia del 5%

En la tabla 5 y 6 de los parámetros reproductivos después de la vacunación contra PRRS en cerdas primerizas vs no vacunadas y su respectivo resumen. Se evaluaron lechones nacidos vivos (LNV), lechones nacidos muertos (LNM), momias y lechones nacidos totales (LNT), las cerdas primerizas no vacunadas tuvieron

LNV= 10,75, LNM= 1.57, Momias= 1.25 y LNT= 11.55; las cerdas primerizas tuvieron LNV= 12,505, LNM= 1.00, Momias= 1.00 y LNT= 12.80. al análisis estadístico los parámetros LNV y LNT tuvieron diferencia significativas $P < 0.05$, demostrándose que cuando las cerdas primerizas son vacunadas, se elevada estos parámetros de gran importancia porque se logra 1.75 lechón por cerda, elevando este parámetro de la granja en beneficio del productor. Se puede observar en la Grafico 3.

Grafico3 parámetros reproductivos después de la vacunación contra PRRS en cerdas primerizas vs no vacunadas.



4.4. Respuesta inmune celular inducida por la vacuna elaborada en cultivo celular

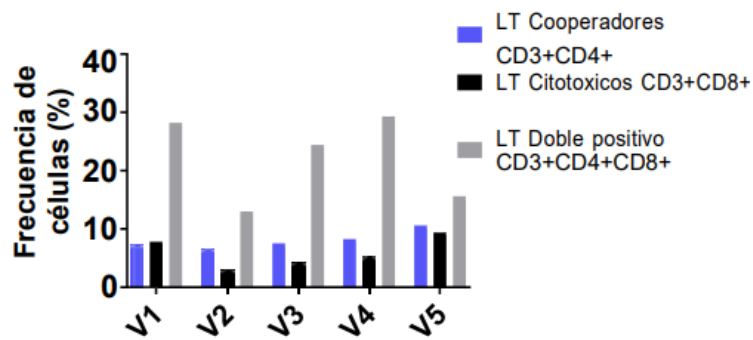
4.4.1. Niveles totales de linfocitos T cooperadores (CD4+), citotóxicos (CD8+) y de los positivos (CD4+CD8+) al inicio del experimento

Una vez realizado el procedimiento de aislamiento y marcación de PBMCs de cerdos se obtuvieron los siguientes resultados. No se hallaron diferencias significativas.

Grafico

4:NivelesdelinfocitosTcooperadores(CD3+CD4+),linfocitosTcitotóxicos(CD3+CD8+)ylinfocitosdoblepositivos(CD3+CD4+CD8+)pormuestra.

N° de muestra	Muestra	% de Linfocitos cooperadores (CD3+CD4+)	T % de Linfocitos positivos (CD3+CD4+CD8+)	doble % de Linfocitos T citotóxicos (CD3+CD8+)
1	V1	7.29 %	7.81 %	28.2 %
2	V2	6.61 %	3.10 %	13.0 %
3	V3	7.55 %	4.28 %	24.4 %
4	V4	8.28 %	5.28 %	29.3 %
5	V5	10.6 %	9.42 %	15.6 %
	Mean	8.07 %	5.98 %	22.1 %
	SD	1.54 %	2.59 %	7.41 %



Las células CD3+CD4+ se consideran Linfocitos T cooperadores naïve, y se encuentran en un porcentaje de 3-14%. Desciende al aumentar la edad.

Las células CD3+CD4+CD8 bajo son consideradas células de memoria y se encuentran en un porcentaje de hasta 55%, que aumenta según la edad(31). Potencialmente pueden ser presentadoras de antígenos debido a la expresión de MHC clase II. Es posible encontrarla en altos porcentajes, sobre todo si el

4.1.2. Niveles de totales de linfocitos B (CD21+) y monocitos cerdo y adulto (hasta un 60%)(32).

Una vez realizado el procedimiento de aislamiento y marcación de PBMCs de cerdo se obtuvieron los siguientes resultados:

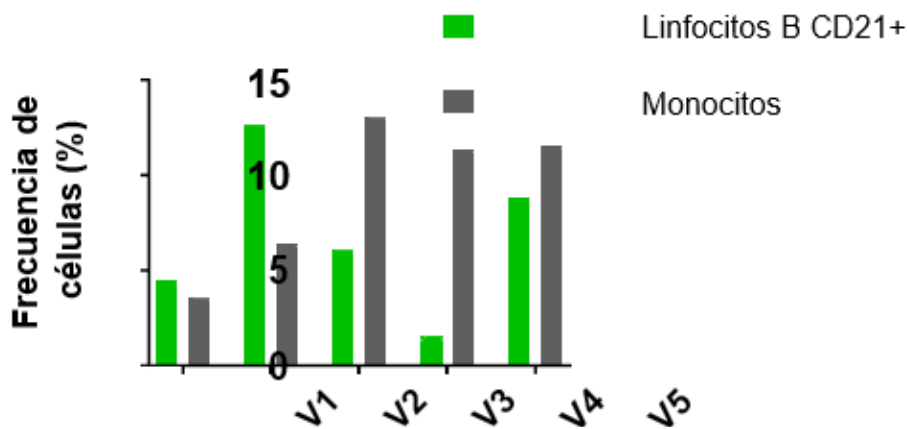
Tabla 8 Valores en porcentajes del total de leucocitos por muestra de poblaciones CD21+(Linfocitos B) y monocitos.

El promedio y la desviación estándar fue determinado por el programa FLOWJO

10.7.1 (software de análisis de citometría de flujo).

N° de muestra	Muestra	% de Linfocitos cooperadores (CD3+CD4+)	% de Linfocitos T positivos (CD3+CD4+CD8+)	% de Linfocitos T citotóxicos (CD3+CD8+)
1	V1	7.29 %	7.81 %	28.2 %
2	V2	6.61 %	3.10 %	13.0 %
3	V3	7.55 %	4.28 %	24.4 %
4	V4	8.28 %	5.28 %	29.3 %
5	V5	10.6 %	9.42 %	15.6 %
	Mean	8.07 %	5.98 %	22.1 %
	SD	1.54 %	2.59 %	7.41 %

Grafico 5 Niveles de linfocitos B (CD21+) y monocitos por muestra.



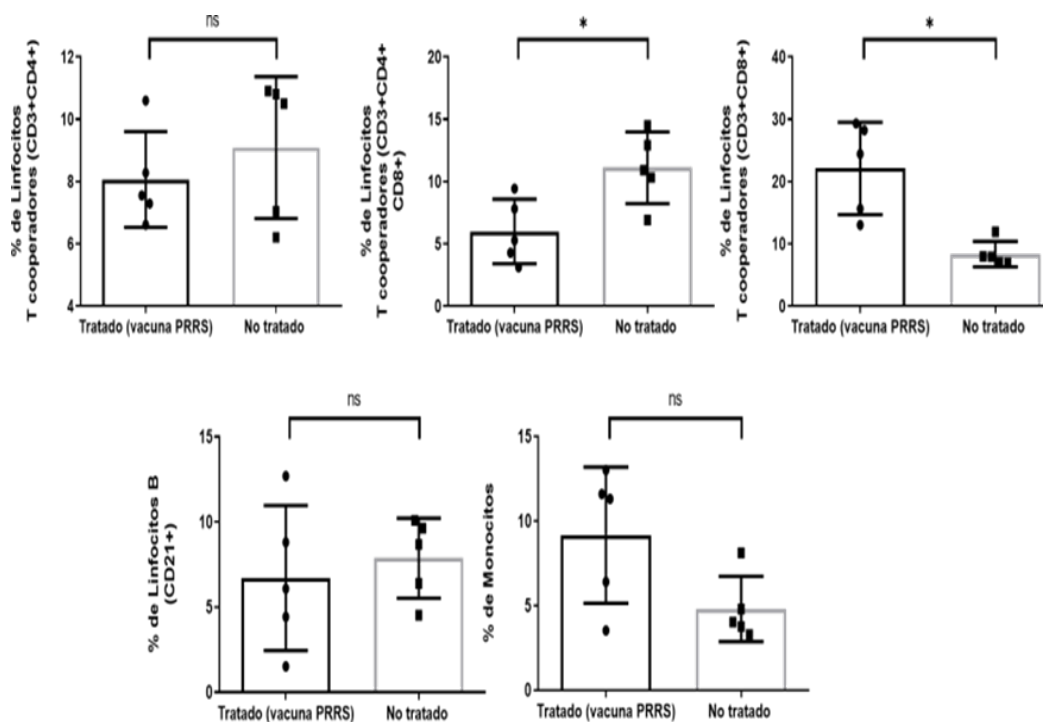
Los valores de Linfocitos B van decreciendo con la edad del animal (Pietrasina et. al., 2020) y se encuentran en mayor proporción en sangre periférica ante una respuesta de defensa de anticuerpos.

En tanto a los monocitos estas células suelen estar en mayor presencia en la sangre periférica ante una infección o en respuesta a una inmunización reciente

Análisis de Grupo tratado vs Grupo no tratado. Vacuna PRRS FARVET.

Se realiza el análisis estadístico de t de student para comparar grupo “no tratado” con el grupo “tratado”. Se considera significativo un p value<0.05.

Grafico 6 Comparación estadística y significancia de cerdos “tratados” vs “no tratados”. Por niveles de linfocitos T cooperadores (CD3+CD4+), linfocitos T citotóxicos (CD3+CD8+), linfocitos doble positivos (CD3+CD4+CD8+), linfocitos B (CD21+) y monocitos por grupo n=5.



El análisis estadístico, se determina valores significativamente más altos de linfocitos T citotóxicos (CD3+CD8+) en el grupo vacunado. Esto puede ser debido a que el grupo vacunado se está defendiendo de un patógeno, del virus vivo de la vacuna, lo que genera inmunidad activa circulante.

Linfocitos dobles ++ (CD3+CD4+CD8+) están significativamente disminuidos en el grupo vacunados en comparación al grupo no vacunado. Estas son células de memoria, antes un estímulo, estas se activan cambiando de fenotipo, lo que explicaría porque esa población esta

disminuida en sangre periférica. Se puede concluir que los individuos vacunados presentan activación del sistema inmune específicamente de células T citotóxicas, una respuesta direccionada a defender el organismo antes infecciones virales.

V DISCUSION

El virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV) es un agente etiológico de una epidemia mundial denominada PRRS, es responsable de los trastornos reproductivos en cerdas y problemas respiratorios en cerdos, y tiene un gran impacto económico como indica Berton, y otros, 2017(8), es importante reconocer esta migración transplacentaria producto de la apoptosis inducida por PRRSV en la placenta y se produce el aborto en el último periodo de gestación; esto causa mortalidad del feto y un incremento de los lechones nacidos muertos, coincidiendo con Alexopoulos(1) y Olanratmanee, Wongyanin, Thanawongnuwech, & Tummaruk, 2015(14). En el Perú se reporta una pérdida de la productividad hasta un 35.6% en su trabajo de tesis de Velásquez Vergara, Vega Vilca, & Lucho Cerga, 2016(4).

Para el control del PRRS en granjas porcinas en la práctica, se han utilizado muchos tipos de estrategias de manejo que incluyen la aclimatación, el manejo de grupos de cría y la vacunación con la vacuna de virus muertos y / o la vacuna de virus vivos modificados (MLV) para controlar los signos clínicos de la infección por el virus PRRS.

Las vacunas son el método más eficaz para poder controlar enfermedades infecciosas. Su protección puede en algunos casos hasta el 100, en otras 90%. Las vacunas son biológicos muy seguro y las reacciones que puede producir son leves y transitorias. Otra cosa que se puede mencionar es que la vacuna es un buen método para erradicar una enfermedad o reducir drásticamente su incidencia, por indicación de Sánchez Vizcaíno (23).

Como lo comprobamos al analizar los perfiles serológicos y las vacunadas tenían títulos más altos que protegen mejor a las primerizas, como también se ve a la prueba de citometría de flujo y a los parámetros reproductivos

Las vacunas vivas atenuadas es el mismo agente infecciosos vivo pero que su virulencia ha sido atenuada, pero si es capaz de producir una inmunidad por mucho tiempo para a enfermedad, indicaciones de Jeong y colaboradores 2017(2). Vacunas muertas o inactivadas, son aquellas que están formadas por virus inactivados ya sea por medio físico o químico. Esta tiene las ventajas que son más estables y seguras, pero no tienen una respuesta inmunitaria como cuando la vacuna es viva, especialmente la ligada a linfocitos T CD4+ con producción de anticuerpos que concuerda con Sánchez-Vizcaíno, 2007(23). Esto coincide con nuestro trabajo en el cuál se ha utilizado como primera dosis la vacuna viva atenuado y a los 30 días post se revacuno con vacuna muerta y los resultados comparativos de CITOMETRIA DE FLUJO de la presencia y cantidad de células protectoras mononucleares de sangre periférica (PBMC) producida 14 días post-, este fue capaz de estimular el incremento de linfocitos antígeno-específicos anti Cólera Porcina, mediante la secreción de interferón ganma y gran proliferación clonal de linfocitos TCD8 (protectores)

El Dr. Daniel Linhares2015 (25), en la Universidad de Minnesota ha evaluado el impacto del uso de dos protocolos de exposición/homogenización. Las granjas que utilizaron el uso de vacuna viva atenuada volvieron rápidamente a su producción anterior y tuvieron la mitad de las pérdidas totales en cerdos destetados, en comparación con las granjas que utilizan la inoculación de virus vivo, esto se relaciona con nuestro trabajo en que las primerizas al parto los parámetros productivos se normalizaron y mejoraron significativamente cuando se comparó con las primerizas no vacunadas, ya que se baja la carga viral rápidamente como lo indica varios autores, cuando se vacuna contra PRRS según los estudios realizados, indican que los cerdos en solo 17 días se encuentran menos aerosoles positivos y a los 30 días ya no se encuentran aerosoles positivos, comparado con

los no vacunados de acuerdo a lo que menciona Cano, Dee, Murtaugh, y Pijoan, 2007(26) y Mateu&Diaz, 2008(27) **“En general mediante la vacunación es el método más rápido y fácil para estabilizar una granja”**

La aclimatación de cerdas de reposición libres de PRRSV es mejor mediante la vacunación. Por esto debe considerarse siempre una primera vacunación con una vacuna viva y un análisis serológico de las núlparas a los 14 días para ver si han sido correctamente vacunadas. En algunos casos, cuando la presión de infección en la granja de destino es elevada, puede considerarse una revacunación 4 semanas después de la primera y al menos 3 semanas antes de la primera inseminación. Si las cerdas de reposición son serológicamente positivas a PRRS debido a una infección previa en su juventud, una dosis única será suficiente (de nuevo con vacuna atenuada para asegurar una inmunidad elevada). La primera inmunización debe realizarse siempre con una vacuna viva mencionado por Kroll y colaboradores 2018(29), es una situación que se debe comprobar y ya no se utilizaría dos vacunas como lo hemos hecho en este trabajo.

El análisis estadístico, se determina valores significativamente más altos de Linfocitos T citotóxicos (CD3+CD8+) en el grupo Vacunado. Esto puede ser debido a que el grupo vacunado se está defendiendo de un patógeno, lo que genera inmunidad activa circulante.

Los linfocitos doble positivos (CD3+CD4+CD8+) están significativamente disminuidos en el grupo Vacunado en comparación al grupo no vacunado. Estas son células de memoria, ante un estímulo, estas se activan cambiando de fenotipo, lo que explicaría por qué esta población esta disminuida en sangre periférica.

VI CONCLUSIONES

1. La granja fue positiva a PRRSV(ORF6) a la prueba de PCR-TR, por lo que tenían fallas reproductivas especialmente en las cerdas primerizas
2. Al inicio del trabajo se realizó la prueba de ELISA y todos salieron también positiva y no se encontraron diferencias significativas entre ellas $P>0.05$.
3. A los 15 días después de la última vacunación los títulos de anticuerpos tuvieron diferencias significativas $P<0.05$, las cerdas primerizas vacunadas mostraron títulos elevados más altos.
4. Los parámetros reproductivos en las cerdas primerizas vacunadas fueron mejores que las que mostraron las cerdas no vacunadas, $P<0,05$
5. Las cerdas vacunadas cuando se les realizo prueba de citometría capaz de estimular el incremento de linfocitos TCD8 (protectores)
6. Los individuos vacunados presentan activación del sistema inmune específicamente de células T citotóxicas una respuesta direccionada a defender el organismo ante infecciones virales.

VII RECOMENDACIÓN

1. Que se debe vacunar y revacunar a las cerdas primerizas con vacuna viva y como segunda dosis la vacuna muerta para mejorar los parámetros reproductivos.
2. Se deben hacer estudios vacunando y revacunado con vacuna viva, ya que como aún no están preñadas no podría afectar la camada, pero las vacunas vivas tienen un mejor efecto inmunológico sobre las muertas.
3. Que las vacunas que se usen, sean de las mismas cepas existentes o realizar autovacunas, para evitar recombinaciones y aparición de otros serotipos.

VIII BIBLIOGRAFÍA

1. Alexopoulos C, Kritas SK, Kyriakis CS, Tzika E, Kyriakis SC. Sow performance in an endemically porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) infected farm after sow vaccination with an attenuated PRRS vaccine. *Vet Microbiol.* 2005 Diciembre; 111(3-4): p. 151-7.
2. Jeong J, Choi K, Kang I, Park C, Chae C. Evaluation of a 20year old porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) modified live vaccine (Ingelvac®) PRRS MLV) against two recent type 2 PRRS virus isolates in South Korea. *Vet Microbiol.* 2016 Agosto; 3(192): p. 102-109.
3. Burgara-Estrella A, Reséndiz-Sandoval M, Cortey M, Mateu E, Hernández C. Temporal evolution and potential recombination events in PRRSV strains in Sonora Mexico. *Vet Microbiol.* 2014 Diciembre; 3(174): p. 540-546.
4. Velásquez Vergara C, Vega Vilca J, Lucho Cerga M. Síndrome Reproductivo Respiratorio Porcino: Presentación en el Tiempo y Efecto sobre los Parámetros Productivos y Reproductivos. *Rev. investig. ve.* 2016; 27(4): p. 813-821.
5. Rueda López M. Low reproductive performance and high sow mortality in a pig breeding herd: a case study. *Ir Vet J.* 2008 Diciembre; 61(12): p. 818-26.
6. López-Soria S, Maldonado J, Riera P, Nofrarías M, Espinal A, Valero O, et al. Selected Swine viral pathogens in indoor pigs in Spain. Seroprevalence and farm-level characteristics. *Transbound Emerg Dis.* 2010 Junio; 57(3): p. 171-8.
7. Duan X, Nauwynck HJ, Pensaert MB. Effects of origin and state of cell differentiation and activation of monocytes/macrophages on their susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Arch. Viro.* 1997; 142: p. 2483-2497.

8. Berton P, Normand V, Martineau GP, Bouchet F, Lebret A, Waret-Szkuta A
Evaluation of porcine reproductive and respiratory syndrome stabilization
protocols in 23 French Farrow-to-finish farms located in a high-density swine
area. *Porc Health Manag.* 2017; 3: p. 11.
9. Prieto C, Castro JM. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus
infection in the boar: a review. *Theriogenology.* 2005 Junio; 16(3): p. 1-16.
10. Zhang H, Xia M, Wang W, Ju D, Cao L, Wu B, et al. Una vacuna contra el virus
del PRRS chino atenuada y altamente patógena confiere protección cruzada
los cerdos contra el desafío con la cepa emergente de PRRSV similar
NADC30. *Virologica Sinica.* 2018; 33(153–161).
11. Lunney JK, Fang Y, Ladining A, Chen N, Li Y, Rowland B, et al. Porcine
Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV): Pathogenesis and
Interaction with the Immune System. *Annu Rev Anim Biosci.* 2016; 4: p. 129
54.
12. Mardassi H, Mounir S, Dea S. Identification of major differences in the
nucleocapsid protein genes of a Québec strain and European strains of porcine
reproductive and respiratory syndrome virus. *The Journal of general virology*
1994 Marzo; 75(3): p. 681-5.
13. Karniychuk UU, Nauwynck HJ. Pathogenesis and prevention of placental and
transplacental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection
Vet Res. 2013 Octubre; 44(1): p. 95.
14. Olanratmanee EO, Wongyanin P, Thanawongnuwech R, Tummaruk F
Prevalence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus detection in

- aborted fetuses, mummified fetuses and stillborn piglets using quantitative polymerase chain reaction. *J Vet Med Sci.* 2015 Setiembre; 77(9): p. 1071-7.
15. Neumann EJ, Kliebenstein JB, Johnson CD, Mabry JW, Bush EJ, Seitzinger AH, et al. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. *J Am Vet Med Assoc.* 2005 Agosto; 227(3): p. 385-92.
 16. Holtkamp DJ, Lin H, Wang C, O'Connor AM. Identifying questions in the American Association of Swine Veterinarian's PRRS risk assessment survey that are important for retrospectively classifying swine herds according to whether they reported clinical PRRS outbreaks in the previous 3 years. *Pre Vet Med.* 2012 Setiembre; 106(1): p. 42-52.
 17. Biernacka K, Stajej T. Comparison of six commercial ELISAs for the detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in field serum samples. *Research in Veterinary Science.* 2011 Diciembre; 121: p. 40-45.
 18. Laguado J. Applications of flow cytometry in microbiology veterinary science and agriculture. *Revista MVZ Córdoba.* 2007 Julio; 12(2).
 19. Maldonado JL, Medrano A, Martinez-Puig D, Artigas C. Extracción de RNA de alto rendimiento y PCR Taqman como ayudas en la ejecución de planes de control o erradicación del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS). *Dialnet.* 2003 mayo;(25): p. 2-6.
 20. Valdes-Donoso P, Jarvis LS, Wright D, Alvarez J, Perez AM. Measuring Progress on the Control of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome

(PRRS) at a Regional Level: The Minnesota N212 Regional Control Project (Rcp) as a Working Example. PLoS One. 2016 Febrero; 11(2).

21. Niederwerder MC, Bawa B, Serão NV, Tribble BR, Kerrigan MA, Lunney JK, et al. Vaccination with a Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) Modified Live Virus Vaccine Followed by Challenge with PRRS Virus and Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) Protects against PRRS but Enhances PCV2 Replication and Pathogenesis Compared to. Clin Vaccine Immunol. 2014 Diciembre; 22(12): p. 1244-54.
22. Jeong J, Kim S, Park KH, Kang I, Park SJ, Park C, et al. Evaluation of the effect of a porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) modified-live virus vaccine on sow reproductive performance in endemic PRRS farms. Vet Microbio. 2017 Setiembre; 208: p. 47-52.
23. Sanchez-Vizcaíno JM. Curso de introducción a la inmunología porcina [Online].; 2007 [cited 2019 Octubre 12. Available from <http://apps.sanidadanimal.info/cursos/inmunologia/ca083.htm>.
24. Geldhof MF, Vanhee M, Van Breedam W, Van Doorselaere J, Karniychuk UL, Nauwynck HJ. Comparison of the efficacy of autogenous inactivated Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) vaccines with that of commercial vaccines against homologous and heterologous challenges. BMC Vet Res. 2012 Octubre8;: p. 182.
25. Linhares DC, Johnson C, Morrison RB. Economic Analysis of Immunization Strategies for PRRS Control. PLoS One. 2015 Diciembre; 10(12).

26. Cano JP, Dee SA, Murtaugh MP, Pijoan C. Impact of a modified-live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine intervention on population of pigs infected with a heterologous isolate. *Vaccine*. 2007 May; 25(22): p. 4382-91.
27. Mateu E, Diaz I. The challenge of PRRS immunology. *Vet J*. 2008 Setiembre; 177(3).
28. Woonwong Y, Kedkovid R, Arunorat J, Sirisereewan C, Nedumpun T, Poonsu K, et al. Oral fluid samples used for PRRSV acclimatization program and sow performance monitoring in endemic PRRS-positive farms. *Trop Anim Health Prod*. 2018 Febrero; 50(2): p. 291-298.
29. Kroll J, Piontkowski M, Kraft C, Coll T, Gomez-Duran O. Initial vaccination and revaccination with Type I PRRS 94881 MLV reduces viral load and infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Porcine Health Manag*. 2018 Agosto; 4(23).
30. Zhao Z, Qin Y, Peng L, Cai X, Wang L, Guo X, et al. Microbial ecology of swine farms and PRRS vaccine vaccination strategies. *Vet Microbiol*. 2012 marzo; 155(2-4): p. 247-56.
31. Charerntantanakul W, Platt R, Roth JA. Effects of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected antigen-presenting cells on T cell activation and antiviral cytokine production. *Viral Immunol*. 2006; 19(4): p. 646-61.
32. Zuckermann FA, Husmann RJ. Functional and phenotypic. *Immunology*. 1996; 87: p. 500-12.

IX ANEXOS

Anexo 1 resultados PSRRV(ORF6) a la prueba de PCR-TR

Laboratorio de Biotecnología Molecular y Genómica(LBMG)



Caso:	143 2020
Solicita:	LMS (Laboratorio de Microbiología y Serología)
	Granja Lurin
Recepción:	lunes, 17 de febrero de 2020 03:35:00 p.m.
Emisión:	martes, 18 de febrero de 2020 06:55:00 p.m.

#	Cod. LBMG	Tipo de muestra	Descripción	Análisis	Resultado	Cuantificación (copias/ul)/ Tipificación	copias/ml	Analista	
1	97	Tarjeta FTA (fta)	LMS-PCR-044	PCV2(ORF2)	detectado	*	*	Y.S	18/02/2020
2	97	Tarjeta FTA (fta)	LMS-PCR-045	CSFV(Npro)	no detectado	*	*	D.V	19/02/2020
3	97	Tarjeta FTA (fta)	LMS-PCR-046	MycoSpp(16S)	detectado	*	*	Y.S	20/02/2020
4	97	Tarjeta FTA (fta)	LMS-PCR-047	PRRSV(ORF6)	detectado	*	*	Y.S	21/02/2020

Nota: Los resultados son expresados en copias/microlitro (1000 ul = 1 ml). (<LoQ) Detectado por debajo del límite de cuantificación; No detectado; *No aplica

Anexo 2 Resultados estadísticos de los parámetros reproductivos de las cerdas primerizas vacunas vs las no vacunadas

Prueba de muestras emparejadas

Diferencias emparejadas

t	gl
---	----

	Media	Desv. Desviación	Desv. Erro promedio	95% de intervalo de confianza de la diferencia		Sig. (bilateral)
				Inferior	Superior	
Par 1 CHANCHILLAS CON INFECCIÓN INICIAL CHANCHILLAS CON VACUNA INICIAL	-,009950	,065306	,014603	-,040514	,020614	-,681 19 ,504
Par 2 CHANCHILLAS CON INFECCIÓN FINAL CHANCHILLAS CON VACUNA FINAL	-,081250	,068815	,015387	-,113456	-,049044	-5,280 19 ,000

Anexo 3 resultados a la prueba de T student para muestras emparejadas

Correlaciones de muestras emparejadas

	N	Correlación	Sig.
Par 1 CHANCHILLAS INFECCIÓN INICIAL CHANCHILLAS CON VACUNA INICIAL	CO20	-,113	,634
Par 2 CHANCHILLAS INFECCIÓN FINAL CHANCHILLAS CON VACUNA FINAL	CO20	-,012	,959

Anexo 4 Prueba de homogeneidad de varianzas para los grupos primeriza vacunadas vs no vacunadas

Estadístico	gl1	gl2	Sig.
Levene			

LECHONES NACIDOS VIVOS		Se basa en la media	2,160	1	38	,150
		Se basa en la mediana	1,950	1	38	,171
		Se basa en la mediana y con ajustado	1,950	1	37,997	,171
		Se basa en la media recortad	1,986	1	38	,167
LECHONES MUERTOS	NACIDOS	Se basa en la media	13,405	1	9	,005
		Se basa en la mediana	2,014	1	9	,190
		Se basa en la mediana y con ajustado	2,014	1	6,000	,206
		Se basa en la media recortad	11,862	1	9	,007
LECHONES MOMIFICADOS		Se basa en la media	4,000	1	4	,116
		Se basa en la mediana	,444	1	4	,541
		Se basa en la mediana y con ajustado	,444	1	3,000	,553
		Se basa en la media recortad	3,004	1	4	,158
LECHONES TOTALES	NACIDOS	Se basa en la media	,805	1	38	,375
		Se basa en la mediana	,967	1	38	,332
		Se basa en la mediana y con ajustado	,967	1	37,370	,332
		Se basa en la media recortad	,924	1	38	,343

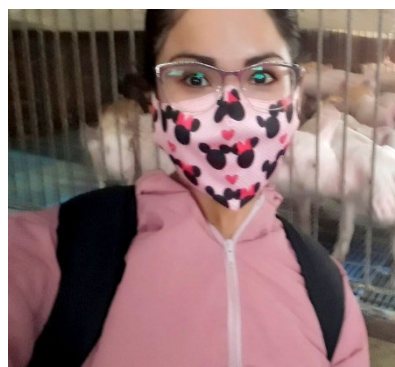
Anexo 5 prueba de ANOVA para grupos de primerizas vacunadas vs n vacunadas

		Suma cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	
LECHONES VIVOS	NACIDC	Entre grupos	30,625	1	30,625	8,152	,007
		Dentro de grupos	142,750	38	3,757		
		Total	173,375	39			
LECHONES MUERTOS	NACIDC	Entre grupos	,831	1	,831	2,014	,190
		Dentro de grupos	3,714	9	,413		
		Total	4,545	10			
LECHONES MOMIFICADOS		Entre grupos	,083	1	,083	,444	,541
		Dentro de grupos	,750	4	,187		
		Total	,833	5			
LECHOONES TOTALES	NACIDC	Entre grupos	15,625	1	15,625	4,783	,035
		Dentro de grupos	124,150	38	3,267		
		Total	139,775	39			

- a. Extracción de muestras (Vena Marginal) con la ayuda de sujetadores para las chanchillas y el personal de la granja.



b. Instalaciones, corrales, comederos y bebederos de la Granja SUMAC PACHA-LURIN



- c. Laboratorio Farvet, muestras que se llevaron a sus instalaciones para ser procesadas y su lectura.

