

Circulación del virus de PRRS y respuesta humoral en fluidos orales de cerdos en dos granjas positivas al virus, con y sin esquemas de vacunación en el Estado de Yucatán, México.

## TESIS

Presentada como requisito para obtener el grado de

**Maestro en ciencias agropecuarias**

POR:

**Médico Veterinario Zootecnista**

**Diana Carolina Sáez Peniche**

**Asesores:**

MSc. Alejandro Alzina López.

DR. Edwin Gutiérrez Ruiz.

MSc. Jorge Carlos Rodríguez Buenfil

Mérida, Yucatán, México, Junio de 2015

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

ALUMNA: M.V.Z. DIANA CAROLINA SÁEZ PENICHE

SÍNODO DEL EXAMEN DE TESIS DE GRADO

MSc. Mario Álvarez Fleites (FMVZ-UADY)

\_\_\_\_\_

DR. Antonio Ortega Pacheco (FMVZ-UADY)

\_\_\_\_\_

MSc. Francisco Aranda Cirerol (FMVZ-UADY)

\_\_\_\_\_

DRA. Guadalupe Ayora Talavera (CIR-Hideyo Noguchi)

\_\_\_\_\_

## **DECLARATORIA DE ORIGINALIDAD**

“El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. 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 UADY para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente”.

---

Médico Veterinario Zootecnista

Diana Carolina Sáez Peniche

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por prestarme salud y vida para poder alcanzar una meta más.

A CONACyT por el apoyo brindado.

A mis asesores M. en C. Alejandro Alzina López y Dr. Edwin José Gutiérrez Ruiz y tutores M. en C. Mario Álvarez Fleites, M. en C. Francisco Aranda Cirerol y Dr. Antonio Ortega Pacheco por toda la paciencia, dedicación y orientación brindada durante la realización de mi maestría.

A la Q.B.A. Sandra Villegas Pérez y a Q.F.B. Vanesa Evia Pech del laboratorio de inmunología de la FMVZ –UADY por el apoyo y las enseñanzas durante la elaboración de las pruebas diagnósticas.

A mi hermanita Ana Laura Sáez Peniche por su ayuda y desvelos junto conmigo.

## **DEDICATORIAS**

Con todo mi corazón para mis abuelos Danilo Peniche Duarte y Nelly Quintal y Ferraez, por estar conmigo en todo momento, su amor, paciencia, dedicación, enseñanzas y motivación para seguir adelante y ser mejores cada día.

A mis papas Fernando Sáez y Norka Peniche, mis hermanas Mariana, Ale y Laura y mi cuñado Carlos Alamilla por el apoyo brindado, no solo durante la realización de mi maestría, sino durante toda mi vida.

A mis sobrinos Adolfo y Manuel, por ser mi alegría, motivarme a ser mejor y darles un buen ejemplo.

A Jerónimo Sepúlveda, Álvaro De la Cruz y Samuel Albores Moreno, a quienes conocí en la maestría y la hicieron más gratificante.

A mis amigos Carolina, Ana y Armando, por su particular forma de apoyarme.

## RESUMEN

Se realizó un estudio prospectivo transversal por conveniencia en 2 granjas porcinas con historial positivo al virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSv), con (granja A) y sin (granja B) esquemas de vacunación con el objetivo de comparar la circulación viral en las áreas de maternidad, destete y engorda en ambas granjas. En cada granja fueron colectadas muestras de fluidos orales semanalmente durante el transcurso de un mes y medio (6 muestreos). Durante cada colecta, las muestras fueron obtenidas de las áreas de maternidad (n=4), destete (n=2) y engorda (n=2), obteniendo un total de 48 muestras por granja.

A cada muestra se le realizó un análisis de inmunoabsorción indirecta ligada a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) para la detección de anticuerpos IgG y un análisis de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) en tiempo real para la detección de ácido nucleico viral.

En la granja A, se encontraron valores S/P elevados en el área de maternidad (5.42), disminuyendo en el área de destete (1.67), hasta ser negativos en la etapa de engorda (0.037). Mientras que en la granja B, solo en el área de maternidad se encontraron casos positivos (1.75) observando una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ). En la prueba de RT-PCR tiempo real no se detectó la presencia de ácido nucleico viral. Se concluye que en el presente estudio no hubo circulación viral en ninguna de las granjas durante el periodo de evaluación, o no fue posible detectarla con el tamaño de muestra utilizado.

Palabras clave: PRRS, fluidos orales, ELISA, RT-PCR tiempo real, circulación viral.

## Summary

A convenience prospective cross sectional study was carried out in two swine farms with history of the presence of the pig reproductive and respiratory virus (PRRSv), with and without the use of vaccination against the virus, with the objective to compare virus circulation in maternity, weaning and fattening areas in both farms. On each farm oral fluid samples were collected weekly for six weeks (six samples). During each collection, samples were obtained from maternity (n=4), weaning (n=2) and Fattening (n=2) areas, making a total of 48 samples from each farm.

Each sample was run using an Enzyme linked immunosorbant assay (ELISA) for the detection of IgG antibodies and Real time RT-PCR for the detection of viral nucleic acids.

On farm A, high S/P values were detected in the maternity area (5.42), decreasing in the weaning area (1.67), to become negative in the fattening area (0.037). While on farm B, there were positive results only in the maternity area (1.75) with an statistically significant difference ( $p < 0.05$ ). In the real time RT-PCR the presence of viral nucleic acid was not detected. It is concluded that in both farms there was no virus circulation during the time of the study or it was not detected with the sample size used.

Key words: PRRS, oral fluid, ELISA, Real time RT-PCR, virus circulation.

## INDICE

|  |    |
|--|----|
| CAPÍTULO I .....   | 1  |
| 1. INTRODUCCIÓN.....                                       | 1  |
| CAPÍTULO II .....  | 3  |
| 2. REVISION DE LITERATURA .....                            | 3  |
| 2.1 Antecedentes .....                                     | 3  |
| 2.2 Etiología.....   | 3  |
| 2.2.1 Características del virus. ....                      | 3  |
| 2.2.2 Estructura viral.....                                | 4  |
| 2.2.3 Capacidad de supervivencia.....                      | 5  |
| 2.2.4 Transmisión .....                                    | 6  |
| 2.2.4.1 Mecanismos de transmisión.....                     | 6  |
| 2.2.4.2 Contagio por inseminación artificial.....          | 6  |
| 2.2.4.3 Factores de riesgo.....                            | 7  |
| 2.3 Patogenia.....   | 7  |
| 2.4 Inmunidad .....  | 9  |
| 2.4.1 Inmunidad Humoral .....                              | 10 |
| 2.4.2 Inmunidad Celular .....                              | 11 |
| 2.4.3 Inmunidad Pasiva .....                               | 12 |
| 2.5 Diagnóstico .....                                      | 13 |
| 2.5.1 Diagnóstico diferencial.....                         | 14 |
| 2.5.2 Signos clínicos.....                                 | 14 |
| 2.5.2.1 Signos clínicos en cerdas reproductoras.....       | 14 |
| 2.5.2.2 Signos clínicos en los verracos .....              | 15 |
| 2.5.2.3 Signos clínicos en lechones, destetes y ceba. .... | 15 |



|   |    |
|---|----|
| 2.5.3 Lesiones macroscópicas y microscópicas .....  | 15 |
| 2.5.4 Pruebas de laboratorio .....  | 16 |
| 2.5.4.1 Aislamiento viral .....   | 16 |
| 2.5.4.2 Análisis de inmunoabsorción indirecta ligada a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés)..... | 16 |
| 2.5.4.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés).....                      | 17 |
| 2.5.4.3.1 RT-PCR tiempo real.....   | 17 |
| 2.5.5 Uso de fluidos orales para monitoreo de enfermedades en cerdos....                              | 17 |
| 2.6 Estrategias de control .....  | 19 |
| 2.7 Vacunación. ....  | 20 |
| 2.7.1 Vacunas atenuadas contra PRRS .....   | 21 |
| CAPÍTULO III .....  | 23 |
| HIPÓTESIS.....  | 23 |
| OBJETIVO GENERAL .....  | 23 |
| 2.8 REFERENCIAS .....   | 24 |
| CAPÍTULO IV. ARTICULO.....  | 35 |
| RESUMEN .....   | 36 |
| ABSTRACT .....  | 37 |
| 1.- INTRODUCCIÓN .....  | 38 |
| 2.- MATERIALES Y MÉTODOS .....  | 39 |
| 2.1 Lugar de estudio .....  | 39 |
| 2.2 Población de referencia .....   | 39 |
| 2.3 Diseño de estudio .....   | 40 |
| 2.4 Obtención de muestras.....  | 40 |
| 2.5 Análisis de laboratorio.....  | 40 |

|                                    |    |
|------------------------------------|----|
| 2.6 Detección de anticuerpos ..... | 41 |
| 2.7.1 Extracción de RNA viral..... | 41 |
| 2.7.2 RT-PCR en Tiempo Real.....   | 41 |
| 3.- RESULTADOS.....                | 42 |
| 3.1 Detección de anticuerpos ..... | 42 |
| 3.2 RT-PCR tiempo real.....        | 44 |
| 4.- DISCUSIÓN.....                 | 45 |
| 5.- Conclusión .....               | 47 |
| REFERENCIAS.....                   | 48 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura1.**-Estructura genómica del virus del PRRS.....4

## ARTÍCULO

**Figura 1.**- Resultados de RT- PCR tiempo real.....44

## ÍNDICE DE CUADROS

### ARTÍCULO

|   |    |
|---|----|
| <b>Cuadro 1.-</b> Porcentaje de muestras de fluido oral positivas a anticuerpos contra el virus de PRRS en la prueba de ELISA y promedios de valores S/P por muestreo en granjas porcinas del Estado de Yucatán con y sin esquemas de vacunación..... | 43 |
|---|----|

# CAPÍTULO I

## 1. INTRODUCCIÓN

La industria porcina se ve afectada por varias enfermedades que tienen un impacto negativo en la producción y economía de los productores. Entre estas enfermedades se encuentra el Síndrome Respiratorio y Reproductivo del Cerdo (PRRS, por sus siglas en inglés), anteriormente conocido como enfermedad misteriosa del cerdo. Fue reconocido clínicamente en EUA en 1987, desde entonces, la infección se ha extendido rápidamente, ha sido detectada en diversos países de Europa, así como en Norte América y Asia (Wensvoort *et al.*, 1991)

Es causado por un arterivirus, que presenta una gran variabilidad genética y antigénica, existiendo grandes diferencias entre los aislamientos europeos y americanos, lo que limita la eficacia de las vacunas actuales (Arias *et al.*, 2002). Otros miembros de este grupo incluyen el virus de la arteritis equina, el virus de la deshidrogenasa láctica del ratón y el virus de la fiebre hemorrágica del simio (Plageman *et al.*, 1992, Cavanagh, 1997).

El PRRS es, en todo el mundo, una de las enfermedades más costosas que afectan a los cerdos. En Estados Unidos se estima que la infección por este virus cuesta a la industria porcina más de 560 millones de dólares al año o el equivalente de más de un millón y medio de dólares al día (Neuman *et al.*, 2005). Se han invertido importantes sumas de dinero en el desarrollo de vacunas que puedan ser efectivas frente a la continua aparición de nuevas cepas, hasta ahora con resultados decepcionantes (Torremorell *et al.*, 2011).

Durante estos últimos años, se han desarrollado y validado nuevas herramientas de muestreo, monitoreo y diagnóstico en los cerdos, que resulten más rápidas, sencillas y menos costosas. Una de estas herramientas es la obtención y el uso de fluidos orales (saliva) como espécimen para diagnóstico en porcinos.

Esta técnica ya ha sido validada experimentalmente para PRRSv, PCV2 e influenza, y se está utilizando de forma rutinaria en los sistemas productivos de EUA para la detección de PRRSv e influenza a nivel de población. La técnica se basa en suspender una cuerda de algodón en el corral para que los cerdos la muerdan mientras depositan su saliva en ella (Prickett *et al.*, 2008).

El método que se propone tiene como ventajas, en comparación con los ya existentes, la disminución en los costos de muestreo (No. de muestras, materiales para muestreo, pruebas de laboratorio), estrés generado en los animales al ser muestreados, daño iatrogénico y horas hombre, principalmente.

Por lo antes mencionado, en relación a la importancia de esta enfermedad, a su diagnóstico y que no existen protocolos bien definidos para el monitoreo de la circulación viral en las granjas, el objetivo del presente trabajo es comparar la circulación viral en las áreas de maternidad, destete y engorda en granjas porcinas con y sin esquema de vacunación a PRRSv.

## CAPÍTULO II

### 2. REVISION DE LITERATURA

#### 2.1 Antecedentes

El síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS) es una enfermedad de origen vírico, que emerge por primera vez a finales de la década de los 80, estando en la actualidad considerado como uno de los problemas más importantes del sector porcino mundial (Arias *et al.*, 2002).

En 1991 se realizó el aislamiento viral en Holanda, se denominó “Virus de Lelystad” en honor al laboratorio donde se aisló por primera vez. Posteriormente se realizó el aislamiento en EUA, donde recibió el nombre de ATTC VR-2332.

Esta enfermedad ha recibido varios nombres: blue ear disease (enfermedad de las orejas azules), mystery swine disease (enfermedad misteriosa del cerdo), mystery reproductive respiratory síndrome (síndrome misterioso respiratorio y reproductivo), swine infertility and respiratory síndrome (síndrome respiratorio y de infertilidad porcino) y a partir de 1993 se denomina síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS) (Zimmerman *et al.*, 1998).

En México, se reportó el aislamiento del virus de cerdos procedentes de Guanajuato, Puebla, México y Veracruz en 1997 (Sierra *et al.*, 1997).

#### 2.2 Etiología

##### 2.2.1 Características del virus.

El agente causal del síndrome es un virus con envoltura de tipo ARN, perteneciente a la familia *Arteriviridae*, del genero *Arterivirus* y del grupo de los *Nidovirus*. La partícula viral es esférica y tiene un diámetro de 50 – 72 nm, poseen una cápside icosaédrica de 20-30 nm que rodea una molécula de ARN con 1.18 -1.19

g/ml de densidad (Arias *et al.*, 2002) y presenta unas proyecciones de superficie de unos 5nm.

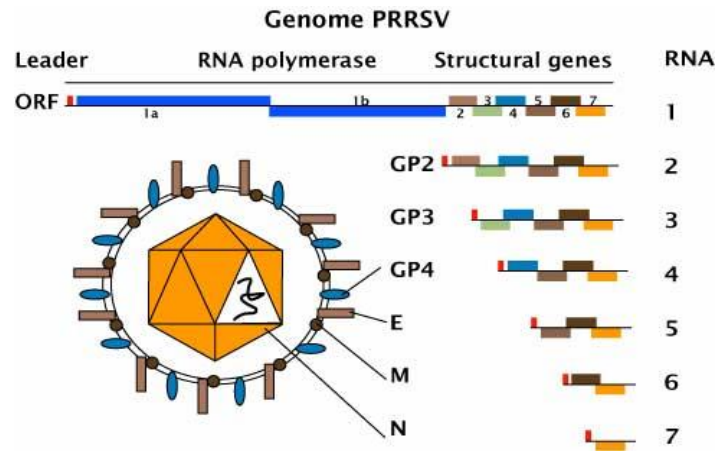


Figura 1. Estructura genómica del virus de PRRS ([www.porcilis-prrs.com](http://www.porcilis-prrs.com))

### 2.2.2 Estructura viral

El genoma del virus consiste de una hebra lineal no segmentada de ARN, de sentido positivo, poliadenilada con 8 marcos abiertos de lectura (ORF del inglés 'open reading frames') (Meulenberg *et al.*, 1998). El primer ORF (Orf 1a y 1b), que comprende aproximadamente el 80% del genoma viral, se ubica en el extremo 5' y está precedido por una secuencia 'leader' no codificante de 211 nucleótidos. Del ORF 2 al 7 se ubican en el extremo 3' del genoma y el final del codón de ORF 7 es seguido por una secuencia no codificante de 14 nucleótidos con una cola poliadenilada de aproximadamente 20 nucleótidos. Cada uno de los ORF está parcialmente superpuesto con cada uno de sus ORF vecinos (Meulenberg *et al.*, 1998). Cada uno de los 6 a 7 ARNm subgenómicos contiene la misma secuencia 'leader' (> de 200 nucleótidos) en su extremo 5' que es idéntica a la secuencia de la región no codificante del extremo 5'. El tamaño de cada transcripto en orden decreciente es de: 15, 3.3; 2.7; 2.2; 1.7; 1.1; y 0.7 kb para los ARNm de 1 a 7, respectivamente. Aislados que expresan 7 ARNm subgenómicos contienen un ARNm extra desde un ORF localizado entre los ORF 3 y 4 y se han designado como ARNm 3,1. A pesar de que la longitud de los transcriptos (ARNm) son policistrónicos, es decir contienen más de un ORF, solamente el primer ORF del extremo 5' se cree que es traducido en una



proteína. No se sabe cuan pronto la célula infectada codifica ARNm virales, pero proteínas virales pueden detectarse en la célula infectada de 6 a 20 horas post infección (Batista *et al.*, 1996).

El producto de cada ORF ha sido identificado en las cepas americana y europea. El ORF 1 codifica para ARN replicasa, la única proteína no estructural que ha sido identificada. Del ORF 2 al 7 codifican para proteínas estructurales. Para la cepa americana VR 2332 se describen proteínas con número de aminoácido de 256, 254, 178, 200, 174 y 123, respectivamente, y para la cepa europea Lelystad el número de aminoácido para su respectivo ORF es de 249, 265, 183, 201, 173 y 128. Las masas moleculares de las proteínas expresadas por los ORF 2 al 7 son: 29 a 30, 45 a 50, 31 a 35, 25,19 y 15 kD, respectivamente. Las proteínas de 29 a 30, (GP2), 45 a 50 (GP3), 31 a 35 (GP4) y 25 kD (GP5) son posiblemente glicosiladas y forman parte de la envoltura del virus. La proteína 19 kD (M) forma parte de la matriz y la proteína de 15 kD (N) es constitutiva de la nucleocápside (Zimmerman *et al.*, 1998).

### **2.2.3 Capacidad de supervivencia**

Al ser un virus con envoltura su capacidad de supervivencia en el medio ambiente no es muy grande, además, está condicionada en gran medida por los cambios de pH a los que es relativamente sensible. La vida media de la cepa *Lelystad*, a 4°C es máxima de 50 horas a un pH = 6.25 y mínima 33 horas a pH= 8.5; a pH 5 su vida media es de 18.8 horas. El almacenamiento a pH 6 y temperatura de 37° C da lugar a una vida media de 6.25 horas, que disminuye si se sube o baja el pH. El virus es estable en medios de cultivo con un pH de 7.5 durante largos periodos de tiempo, si se mantiene a temperaturas de -70° C a -20° C (Prieto y Castro, 1998a).

Se ha estudiado la supervivencia del virus en la carne y se ha comprobado que es posible encontrarlo en las amígdalas, los ganglios linfáticos, el pulmón, el suero y, ocasionalmente, en el tejido muscular cuando se sacrifican animales poco después de la infección. Sin embargo, no se detecta en el hígado, el corazón, el riñón, o la médula ósea ni tampoco en el tejido muscular cuando pasan más de 48 horas desde el

sacrificio. Los títulos en el tejido muscular o en los órganos no sufre prácticamente alteraciones por el almacenamiento de hasta 48 horas a 4° C (Arias *et al.*, 2002).

El aislamiento esporádico en el tejido muscular se debe probablemente a la presencia del virus en el plasma sanguíneo que se encuentra en los capilares. La vida media en esta localización, teniendo en cuenta el pH del tejido muscular, es de entre 23 y 43 horas (Arias *et al.*, 2002).

## **2.2.4 Transmisión**

### **2.2.4.1 Mecanismos de transmisión**

El virus, se difunde rápidamente dentro de la granja, por contacto directo (Pol *et al.*, 1991) o por aerosoles (Terpstra *et al.*, 1991). Los casos mejor documentados de transmisión de la enfermedad son los debidos al movimiento de animales enfermos.

Estos animales pueden transmitir la enfermedad por contacto hasta 14 semanas después de la inoculación experimental. El virus se puede eliminar por distintas vías; siendo posible aislarlo de las fosas nasales, saliva, orina, secreciones prepuciales y heces de animales infectados; aunque el aislamiento a partir de las heces, no siempre es posible (Prieto y Castro, 1998a).

Otra forma importante de transmisión, es la vertical, en donde el virus es capaz de atravesar la barrera placentaria e infectar a los fetos en el útero, lo que da lugar a la aparición de lechones virémicos y/o presentar anticuerpos específicos al virus al nacimiento. Puede aislarse durante un período de 11 días en el agua de la canalización, de 9 días en agua de pozo y de 4 a 6 días en soluciones amortiguadoras; de la saliva, la orina y las heces, sólo se ha podido aislar el día de la contaminación (Prieto y Castro, 1998a).

### **2.2.4.2 Contagio por inseminación artificial.**

Existen evidencias epidemiológicas y experimentales, que el virus puede diseminarse por inseminación artificial, cuando se usa semen obtenido en la fase

aguda de la infección; ya que es posible aislar el virus del semen de verracos infectados experimentalmente (Swenson *et al.*, 1994; Prieto *et al.*, 1998b; Prieto *et al.*, 1997).

Se disemina en tejidos finos completos, incluyendo el tracto reproductivo, 21 días posteriores a la infección. El virus puede entrar en el semen por los tejidos finos epididimales y las fuentes del virus en semen son monocitos infectados por el virus.

#### **2.2.4.3 Factores de riesgo.**

Explotaciones con un gran número de animales, ausencia de cuarentena, un elevado nivel de reposición y el nivel de la densidad porcina de la región puede incidir como un importante factor de riesgo en la difusión del PRRSv. Podemos decir que en una granja libre de PRRS se consideran importantes factores de riesgo los siguientes: Introducción de animales no controlados, no realizar cuarentenas, situación próxima a granjas infectadas y granjas de gran tamaño (>1000 cerdas) ([www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar)).

### **2.3 Patogenia**

El período de incubación es muy variable, desde 3 días a varias semanas, dependiendo de la edad de los animales, que también va a ser decisiva en la presentación clínica de la enfermedad.

Se considera que el virus inicia la infección en el cerdo en las vías de entrada, principalmente por la ruta oronasal, a través del epitelio nasal, tonsilar, y macrófagos pulmonares. Otra ruta a destacar es la vía vaginal donde el virus infecta el endometrio uterino (Arias *et al.*, 2002).

En el proceso de infección viral, la adherencia del virus PRRS a la célula blanco, se realiza a través de una proteína receptora de 210 kD que está presente en la mem-

brana celular de macrófagos alveolares porcinos (MAP) permisibles (Duan *et al.*, 1998). Inmediatamente después, las partículas virales son endocitadas mediante un proceso dependiente de microfilamentos a través de pequeñas vesículas.

Posteriormente se produce la fusión de la envoltura viral con la membrana del fagosoma, favorecido por el pH ácido del medio. De esta manera, la nucleocápside viral ingresa al citoplasma para la replicación (Kreutz y Ackerman, 1996).

En el citoplasma se sintetizan las proteínas virales no estructurales y estructurales. Inmediatamente de ser sintetizadas las proteínas M y E, son transportadas hacia el retículo endoplásmico (RE) donde la proteína M interactúa con la proteína E. En este lugar se acumulan estas proteínas que posteriormente conformarán la matriz y envoltura del virión. La proteína N, ingresa al RE para completar el ensamblaje del virus. A las tres horas post infección (PI), aparecen los primeros signos de daño celular con la formación de pequeñas vesículas de doble membrana, producto de la degeneración mitocondrial. A las seis horas PI, la nucleocápside protruye del RE liso, el lumen del RE que contiene partículas virales envueltas y es posible detectar antígenos virales en el citoplasma (Suarez, 2000).

Los viriones envueltos se acumulan mayoritariamente en el lumen del RE provocando su dilatación. Las nuevas partículas vírales entran en un proceso de maduración dentro de vesículas en la zona comprendida entre el RE y la parte media del aparato de Golgi. Posteriormente las vesículas que contienen las nucleocápsides virales son transportadas por Golgi. Finalmente las vesículas son eliminadas por la membrana celular por exocitosis o lisis celular (Suarez, 2000).

Los animales infectados eliminan virus principalmente por saliva (42 dPI), orina (14 dPI), semen (Desde la 2da semana hasta 43-92 dPI, según estudios) y secreciones mamarias (Arias *et al.*, 2002).

Se ha podido demostrar que el virus puede replicarse en las células epiteliales de los túbulos seminíferos; principalmente en espermatozoides y espermatoцитos, lo cual se ha observado en el semen 7 días post-infección. Una consecuencia de la

replicación, es la poca producción de espermatozoides y muerte de la célula germinal, que induce a apoptosis (Bouma, 2000), también se observa un aumento en el número de células espermáticas inmaduras.

La inseminación de cerdas con semen infectado con virus del PRRS, provoca la infección en las cerdas, pero no afecta la fertilización de los ovocitos y el desarrollo embrionario (Bouma, 2000). Los verracos pueden no demostrar signos clínicos, seroconversión y/o viremia.

Durante el primer tercio aparecen repeticiones de celo y bajas tasas de concepción, lo cual indicaría que la infección transplacentar temprana es posible.

La viremia en los animales jóvenes puede durar más de un mes, pudiendo llegar el virus a distintos órganos, como corazón, hígado, riñones, cerebro, pulmón, nódulos linfáticos peribronquiales, timo, amígdalas, médula ósea y especialmente bazo, en cuyos macrófagos se replica activamente (Arias *et al.*, 2002)

A pesar de las diferencias observadas en cuanto a la virulencia de distintos aislados de PRRS, incluso dentro de un mismo grupo, el tropismo hacia los distintos tejidos y la distribución de antígenos y del ácido nucleico viral es muy similar. Se han descrito cepas apatógenas de PRRS y también cepas que muestran importantes diferencias en cuanto a su virulencia para causar problemas reproductivos (Arias *et al.*, 2002).

## **2.4 Inmunidad**

La respuesta inmune del cerdo frente al PRRSv es muy compleja y se deben considerar dos aspectos importantes que influyen en ella: alta variabilidad del virus y variabilidad en la respuesta de los cerdos infectados. Cuando estos últimos resultan con infección por el PRRSv inducen una inmunidad capaz de proteger en reinfecciones contra virus homólogos, e induce viremias prolongadas e infecciones persistentes (Murtaugh *et al.*, 2002). Estas características dan un panorama de la compleja interacción entre el PRRSv y la defensa de los cerdos al virus.

### 2.4.1 Inmunidad Humoral

La respuesta humoral frente al PRRSv se ha evaluado ampliamente. En suero de cerdos infectados se pueden encontrar anticuerpos IgM anti-PRRSv entre los días cinco y siete pos-infección (PI); sin embargo, después de dos o tres semanas son indetectables (Joo *et al.*, 1997, Yoon *et al.*, 1995). Posteriormente se detectan anticuerpos IgG entre los días siete y diez PI, con incremento entre la segunda y cuarta semanas (Loemba *et al.*, 1996, Yoon *et al.*, 1995). Los niveles de estos anticuerpos son detectables hasta 300 días PI a niveles bajos (Nelson *et al.*, 1994).

Los anticuerpos anti-PRRSv del tipo IgA son detectados a partir de los 14 días PI con su pico máximo a los 25 días hasta que desaparecen al mes, aproximadamente (Loemba *et al.*, 1996, Yoon *et al.*, 1995). Se ha informado que los anticuerpos neutralizantes (AN) aparecen a partir de la tercera semana PI; (Loemba *et al.*, 1996, Albina *et al.*, 1998) sin embargo, existen estudios que muestran la presencia de AN en la segunda semana PI (día 9) (Yoon *et al.*, 1995) Esta respuesta temprana se presenta en algunos de los cerdos evaluados; sin embargo, a la tercera semana todos los cerdos muestran AN. Estas diferencias en la presencia de AN se debe a la variabilidad en la respuesta de los cerdos al PRRSv, sin embargo, los AN que se producen pueden permanecer durante periodos prolongados pero con títulos bajos (Loemba *et al.*, 1996, Yoon *et al.*, 1995).

Los primeros anticuerpos anti-PRRSv se dirigen contra la proteína N durante la primera semana PI, sin embargo no tienen un efecto neutralizante (Loemba *et al.*, 1996, Nelson *et al.*, 1994). Estos anticuerpos se han relacionado con la diseminación del PRRSv en macrófagos, a través de un fenómeno conocido como incremento de la infección dependiente de anticuerpos (*Antibody Dependent Enhancement*, ADE, por sus siglas en inglés) (Cancel *et al.*, 2004). A pesar de que existen anticuerpos no neutralizantes contra la GP5, también se pueden encontrar AN, éstos son los que se han relacionado principalmente con la neutralización del virus para ambos genotipos. Estos AN pueden ser detectados en algunos casos de

manera temprana a partir del día 9 PI; sin embargo, generalmente se presentan a partir del día 28 PI (Yoon *et al.*, 1995). También se han detectado AN contra GP4, proteína M y en menor grado contra GP3 (Weiland *et al.*, 1999, Loemba *et al.*, 1996, Yoon *et al.*, 1995, Cancel *et al.*, 2004).

La participación de los AN en la protección contra el PRRSv se ha evaluado ampliamente, y existe cierta controversia respecto de su participación en la protección contra el PRRSv. Se ha observado que la transferencia pasiva de AN a cerdas gestantes infectadas con PRRSv es capaz de bloquear la infección trasplacentaria (Osorio *et al.*, 2002).

#### **2.4.2 Inmunidad Celular**

La respuesta celular se puede evaluar mediante la producción de IFN- $\gamma$  o células productoras de IFN- $\gamma$ . En la respuesta celular inducida por el PRRSv se han evaluado ambos aspectos.

La respuesta de células T específicas contra el PRRSv, analizadas mediante la proliferación de células mononucleares, aparece en la cuarta semana PI con un máximo a la semana siete y un declive entre las semanas 9 y 11 (Batista *et al.*, 1997). Sin embargo, otros estudios muestran que esta respuesta se detecta de manera débil a moderada a partir de la segunda semana PI, y se incrementa en la semana cuatro PI (Xiao *et al.*, 2004). Estas diferencias pueden deberse a la cepa del virus utilizada o a la variabilidad en la respuesta de los cerdos. En ambos casos, el fenotipo de células T secretoras de IFN- $\gamma$  en respuesta al PRRSv parece consistir de linfocitos CD4+CD8+ de memoria y CD4+ cooperadoras (López *et al.*, 1999, Meier *et al.*, 2003).

La expresión de IFN- $\gamma$  se evaluó a nivel de transcritos en células de ganglios linfáticos, pulmón y sangre periférica de cerdos infectados con PRRSv. En todos los casos hubo expresión significativa de ARNm del IFN- $\gamma$ ; sin embargo, el IFN- $\gamma$  producido no es suficiente o no es efectivo en la eliminación del virus debido a que también fue posible detectarlo en estos ganglios y tejidos (Rowland *et al.*, 2001).

El papel de la inmunidad mediada por células en la eliminación del PRRSv no está totalmente definido; sin embargo, es importante en la eliminación completa del virus, pues la respuesta humoral sola no es capaz de eliminar al virus.

### 2.4.3 Inmunidad Pasiva

La resistencia inicial que se presenta frente al PRRSv depende principalmente de la respuesta antiviral de las células infectadas y del sistema inmune innato en los primeros días antes del desarrollo de la respuesta adaptativa. El virus toma ventaja frente al cerdo al evadir en cierto grado la respuesta innata. Primeramente, el PRRSv infecta y se replica en algunas células que participan en la respuesta innata, como macrófagos y células dendríticas, importantes en el desarrollo de una respuesta inmune adecuada tanto innata como adaptativa (Wang *et al.*, 2007, Flores-Mendoza *et al.*, 2008, Costers *et al.*, 2006). Otra característica importante del sistema innato frente a los virus es la producción de IFN tipo I ( $\alpha/\beta$ ), el cual induce la síntesis de una gran cantidad de proteínas antivirales, como es el caso de la proteína cinasa R, 2'-5' oligoadenilato-sintetasa, la adenosina-deaminasa específica de ARN, y de la proteína de mixoma (MxGTPasa), que inhiben la replicación viral y síntesis de proteínas virales (Vicek *et al.*, 1996). El PRRSv logra inhibir la expresión del IFN tipo I tanto *in vivo* como *in vitro* (Van *et al.*, 1999, Albina *et al.*, 1998), pero la administración del IFN- $\alpha$  exógena inhibe la replicación del virus y favorece la respuesta humoral (López *et al.*, 2000).

En lo que respecta al perfil de citosinas proinflamatorias, como el IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , que son importantes en el inicio de una respuesta inflamatoria, la infección por el PRRSv inhibe la expresión de ARNm de estas citosinas (Van *et al.*, 1999, Choi *et al.*, 2002). En experimentos *in vitro* utilizando macrófagos alveolares estimulados con acetato de forbol mirístico (PMA, por su siglas en inglés) e infectados con PRRSV, se observó una disminución en la expresión de ARNm de TNF- $\alpha$  (López *et al.*, 2000). Mientras que los experimentos *in vivo* no logran detectar esta citosina (TNF- $\alpha$ ) en los fluidos obtenidos de lavados broncoalveolares (Van *et al.*, 1999). Asimismo, se ha observado que el IFN- $\alpha$  es capaz de inhibir la replicación del PRRSv en cultivos de macrófagos alveolares; sin embargo, la expresión de esta citosina en



lavados broncoalveolares fue mínima (Albina *et al.*, 1998, Choi *et al.*, 2002). Por lo anterior, se entiende que el virus logra, de alguna manera, modular la producción de INF- $\alpha$  en los macrófagos para asegurar su replicación en éstas y otras células. Se ha pensado que esta modulación puede ser a nivel de transcripción (Miller *et al.*, 2004) aunque otros estudios también sugieren que ésta se lleva a cabo al inhibir la síntesis de proteínas antivirales (Lee *et al.*, 2004). Se ha demostrado que al infectar células mononucleares con el PRRSv se induce la expresión de IL-10 (Suradhat *et al.*, 2003), la cual es una citosina antiinflamatoria que logra inhibir la expresión de la IL-1 y el TNF- $\alpha$ , y además participa en la diferenciación de células T reguladoras (Meguirk *et al.*, 2002). La falta de una respuesta inflamatoria y la débil o nula respuesta antiviral (inducida por los IFN tipo I) crea un microambiente desfavorable en el desarrollo de la respuesta adaptativa.

## 2.5 Diagnóstico

Las manifestaciones clínicas del PRRSv son variables existiendo muchos factores que dificultan el correcto diagnóstico de la enfermedad. La forma subclínica de la enfermedad (endémica) es frecuente en las explotaciones no existiendo a menudo, claros síntomas clínicos que aseguren la presencia de la enfermedad (Arias *et al.*, 2002).

En el diagnóstico de esta enfermedad deben de considerarse los siguientes factores: Historial de la explotación, signos clínicos y lesiones, registros de producción, serología y detección del virus. En general se debe de sospechar de la enfermedad cuando existen signos clínicos de enfermedad respiratoria y/o insuficiencia reproductiva y/o bajo rendimiento productivo (Arias *et al.*, 2002).

En una fase clínica clara de la enfermedad, la duración de la misma puede variar entre 1- 4 meses o más tiempo ya que depende de la velocidad con la que se transmite la enfermedad dentro de la explotación (influida por el diseño de la explotación, movimiento de animales dentro de la misma y sistema de producción utilizado) (Arias *et al.*, 2002).

### **2.5.1 Diagnóstico diferencial**

En el diagnóstico diferencial se deben considerar las siguientes enfermedades, ya que la sinología es muy parecida: El diagnóstico diferencial de la enfermedad respiratoria incluye: virus de la influenza A, circovirus porcino tipo 2, coronavirus respiratorio porcino, virus de Aujeszky, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis*, *Salmonella choleraesuis*, *Haemophilus parasuis*, y *Pasteurella multocida*. En problemas reproductivos, el diagnóstico diferencial incluye: parvovirus porcino, virus de la influenza A, enterovirus/teschovirus porcino, virus de Aujeszky, virus de la peste porcina clásica, citomegalovirus porcino y leptospirosis ([www.3tres3.com](http://www.3tres3.com)).

### **2.5.2 Signos clínicos**

Los dos grupos principales de signos clínicos que son asociados con la presencia de PRRSv son el reproductivo y el respiratorio (White, 1991).

Los signos clínicos de PRRS varían considerablemente debido a varias causas; incluyendo diferencias en la susceptibilidad de la piara, los factores ambientales, el estado inmune, la cepa del virus; así como su combinación con otros virus que afecten a los cerdos (Done, 1995).

#### **2.5.2.1 Signos clínicos en cerdas reproductoras**

Las cerdas pueden presentar signos clínicos leves o severos. Normalmente se observa anorexia, somnolencia, fiebre, inapetencia en un 8 – 10% de las cerdas, ocasionalmente muestran cianosis en orejas, vulva y cola (Done, 1995). Los problemas reproductivos se manifiestan en abortos a mitad de la gestación de un 2 a 3%, mortinatos, momias, aumento en el número de lechones débiles, partos prematuros (107 – 112 días) en un 18-20%, agalaxia en un 30% de las cerdas e infertilidad generalizada; que pueden durar de 2 a 3 meses (Albina *et al.*, 1992) y muerte súbita en un 1.5 % de las reproductoras, afectando algunos parámetros como porcentaje de fecundación, número de lechones vivos al nacimiento y mortalidad antes del destete (Méndez, 1996).

### **2.5.2.2 Signos clínicos en los verracos**

En los verracos, se observa: anorexia, somnolencia, fiebre (Done y Paton, 1995), así como baja en la libido (Hooper *et al.*, 1992); sobre todo, pobre calidad seminal, expresada en volumen, motilidad y concentración espermática por debajo de los estándares y en aumento de anomalías de los espermatozoides; lo cual, definitivamente, perjudican al potencial reproductivo de los machos (Lager *et al.*, 1992).

### **2.5.2.3 Signos clínicos en lechones, destetes y ceba.**

Se observan lechones nacidos débiles, momificados, conjuntivitis, quemosis grave, disnea, apatía, anorexia, emaciación, letargia, baja tasa de crecimiento, diarreas que no responden a tratamientos, aumento en la mortalidad, animales con mal desarrollo y mucha variabilidad entre los animales (Arias *et al.*, 2002, Done y Paton, 1995).

### **2.5.3 Lesiones macroscópicas y microscópicas**

Las lesiones macroscópicas más características son en los nódulos linfáticos que aparecen aumentados de tamaños, de color tostado a gris, en los pulmones se observan áreas focales o difusas de consolidación pulmonar. A nivel reproductivo, sólo a veces se presentan hemorragias segmentales en el cordón umbilical de cerditos nacidos vivos o muertos (Mengeling y Lager, 2000).

Microscópicamente se observa hiperplasia de los nódulos linfáticos y a nivel pulmonar, en forma local o difusa, un infiltrado de células mononucleares. Las cerdas afectadas pueden presentar una leve a moderada miometritis y una endometritis linfoplasmocítica (Mengeling y Lager, 2000). La presentación de alguna o todas las manifestaciones clínicas en un plantel pueden llevar a sospechar de la participación del virus, no obstante, para confirmar la presencia del virus es imprescindible el diagnóstico de laboratorio (Mengeling y Lager, 2000).

## **2.5.4 Pruebas de laboratorio**

En la actualidad existen varias pruebas de laboratorio, que facilitan el diagnóstico de las enfermedades que afectan a los animales. Para la detección del PRRSv al día de hoy, es posible identificar virus viables (aislamiento del virus [VI]), antígenos virales (inmunohistoquímica, inmunofluorescencia directa), ácidos nucleicos virales (reacción en cadena de la polimerasa [PCR], hibridación in-situ) y anticuerpos IgG circulantes (inmunofluorescencia indirecta, test IDEXXELISA®, seroneutralización).

### **2.5.4.1 Aislamiento viral**

El PRRSV se puede aislar en macrófagos alveolares del cerdo o en una línea celular continua derivada de riñones de mono verde africano conocida como células MA-104; sin embargo, el aislamiento de virus es un trabajo intensivo, tiene un bajo nivel de sensibilidad en comparación con la PCR y depende de los virus viables presentes en la muestra. El tiempo de realización del aislamiento puede ir de 8 días a varias semanas de trabajo. (Arias *et al.*, 2002)

### **2.5.4.2 Análisis de inmunoabsorción indirecta ligada a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés).**

La prueba de análisis de inmunoabsorción es una técnica diagnóstica ampliamente utilizada para la detección de anticuerpos frente al virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSv), ya que es una prueba altamente sensible y específica (98.8 % y 99.9% respectivamente), la cual es muy fácil de realizar y económica.

Es una técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable como cambio de color o algún otro tipo.

Actualmente se encuentran kits comerciales, entre ellos el IDEXX PRRS, el cual se ha creado con un formato de microaglutinación revistiendo la placa con antígenos del virus de PRRS que forma un complejo con los antígenos que revisten el

pocillo, es capaz de detectar la formación de anticuerpos frente a PRRSv de 9 a 13 días después de la exposición al virus. Los resultados se presentan en forma de proporción de muestra a positivos (s/p) donde niveles de 0,4 o superiores se consideran positivos.

#### **2.5.4.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés).**

Esta prueba se emplea para identificar al virus y caracterizarlo; se puede utilizar prácticamente cualquier muestra biológica, es más sensible que el aislamiento viral tradicional. Es una técnica altamente sensible y específica (99%). Esta prueba consiste en la amplificación de un segmento del material genético del PRRSv, generalmente el segmento utilizado es la fracción ORF 5 la cual codifica para la producción de la proteína de la nucleocápside.

##### **2.5.4.3.1 RT-PCR tiempo real**

La RT-PCR es una variante del PCR tradicional, ya que se utiliza ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) proveniente del ácido ribonucleico mensajero (ARNm). Esta conversión se logra mediante una reacción conocida como transcriptasa reversa, capaz de convertir el ARNm en una molécula de ADNc. Este método fue copiado de los retrovirus que usan una transcriptasa reversa para convertir su genoma de ARN en ADN y duplicarse en millones de partículas virales (Herschhorn e Hizi, 2010). Se le llama PCR en tiempo real, ya que después de cada ciclo de amplificación se mide la fluorescencia generada por uno o más productos específicos.

#### **2.5.5 Uso de fluidos orales para monitoreo de enfermedades en cerdos.**

El diagnóstico de infecciones basados en el uso de fluidos orales es relativamente nuevo en medicina veterinaria, pero se ha utilizado ampliamente en medicina humana, particularmente en los últimos 25 años (Prickett y Zimmerman, 2010).

La prueba de movimiento de anticuerpos del suero a la cavidad oral fue proporcionada por Challacombe *et al* (1978), quien demostró que anticuerpos IgG, IgM e IgA marcados con radio isótopos que fueron inyectado en monos Rhesus fueron detectados en fluidos bucales poco después. La producción local de anticuerpos por células plasmáticas en las glándulas salivales y tejido linfoide asociado a los conductos (DALY) fue establecida también en esa época (Beckenkamp, 1985; Brandtzaeg, 1981, 1989; Crawford *et al.*, 1975; Mestecky 1987, 1993; Morrier y Barsotti, 1990; Nair y Schoeder, 1986). Las células plasmáticas mostraron secretar IgA en saliva en conjunción con las células epiteliales ductales y acinares expresando receptores específicos para IgA. IgM e IgG también resultaron ser secretadas localmente, pero en menor concentración (Challacombe *et al.*, 1997).

Corthier (1976) describió por primera vez la detección de anticuerpos contra el virus de la fiebre porcina clásica (CSFV) en los fluidos orales porcinos. Trabajos posteriores demostraron que la inoculación intranasal o intramuscular con CSFV produce niveles detectables de anticuerpos en suero y fluidos orales (Corthier y Aynaud, 1977). Más tarde Prickett *et al.* (2008b) y Kittawornrat *et al.* (2010) demostraron que era posible detectar al PRRSV en fluidos orales.

A la fecha, la mayoría de muestras de fluidos orales porcinos son analizadas por PCR debido a que estos ensayos ya están disponibles para la mayoría de los productores.

Como ejemplo de monitoreo basado en PCR, Ramírez *et al* (2012) siguió 12,150 cerdos en 10 áreas de destete-finalización de 10 granjas mediante fluidos orales recogidos y probados a intervalos de 2 semanas para PCV2, PRRSV, virus de la gripe A (IAV) y genogrupos 1 (TTV1) y 2 (TTV2) de Torque tenovirus. El estudio concluyó que las muestras de fluidos orales podrían colectarse y enviarse al laboratorio por personal en el sitio y el análisis de una variedad de parámetros de producción en el contexto de la circulación de patógeno podría proporcionar información oportuna para apoyar las intervenciones para prevenir, controlar, o eliminar agentes infecciosos. Por lo tanto, un enfoque basado en la PCR puede eficiente y eficazmente detectar la circulación de los agentes patógenos en granjas.

Más recientemente, los ensayos de anticuerpos se han adaptado a fluidos orales (Kittawornrat *et al.*, 2012; Langenhorst *et al.*, 2012). Basado en muestras de fluido orales positivas (n = 492) y negativas (n = 367), Kittawornrat *et al* (2012), estimaron que la sensibilidad y especificidad diagnóstica de una prueba de ELISA para detectar IgG contra PRRSv en fluidos orales, utilizando un punto de corte  $\geq 0.40$ , fue 94,7% (IC 95%: 92.4, 96.5) y 100% (95% IC: 99.0, 100.0) respectivamente. Basándose en estos datos, se concluyó que esta prueba podría proporcionar un enfoque eficaz y rentable para el monitoreo rutinario de PRRSv en piaras comerciales y en programas de eliminación de PRRSv.

## **2.6 Estrategias de control**

Las medidas de control dependerán de la situación epidemiológica del virus en cada granja, así como la presencia de otros patógenos en cada etapa de producción.

El objetivo de los esquemas de control es evitar la continua circulación del virus dentro de la granja, teniendo como finalidad la estabilización de la población. Para lograr esto es muy importante tener en cuenta los factores que provocan la continua circulación del virus en una granja tales como la incorporación continua de animales, reposición con cerdas virémicas y poblaciones grandes (> 500 hembras) recientemente infectadas o que tengan subpoblaciones no infectadas ([www.bi-vetmedica.com.mx/prrs/prrs.htm](http://www.bi-vetmedica.com.mx/prrs/prrs.htm)).

Algunas de estas estrategias de control son:

En el pie de cría

Cierre de granja: el cual consiste en el cese de la introducción de cerdas de reposición, obteniendo los reemplazos seleccionados de la engorda de la misma granja. El procedimiento limitará el ingreso de poblaciones de cerdos nuevos, ya sean infectados o susceptibles. Esto limitará la circulación continua del virus de campo, además de evitar el ingreso de nuevos aislamientos virales a la unidad.

Cuarentena de reemplazos: consiste en preparar instalaciones fuera o dentro de la granja, pero sin compartir espacio aéreo, en las que pueda realizarse el aislamiento y adaptación requerido, previo a la introducción de las hembras a el hato reproductor por un lapso de 6 a 8 semanas.

### Área de engorda

Sistemas de producción en sitios múltiples: estos sistemas tienen por finalidad mantener a los animales por lotes de edades iguales en distintas localizaciones para disminuir la transmisión de forma natural que se puede producir de los animales más viejos a los más jóvenes.

Aunque este sistema puede fallar y se pueden infectar las lechonerías, en cualquier caso el alto nivel sanitario que proporciona este sistema de producción hace que la infección no produzca las pérdidas que produce en los sistemas convencionales (Prieto y Castro, 1998).

Otra práctica que se realiza es el sistema de "todo dentro- todo fuera": que consiste en establecer grupos de animales que tengan todos la misma edad y entren y salgan a la vez a una zona de producción. Evitando el movimiento de aire entre las distintas salas, así como el contacto directo entre animales. Las salas se deben limpiar y desinfectar entre cada nuevo grupo de animales, este sistema evita el contacto entre animales más jóvenes con los más viejos, rompiendo de esta forma la circulación del virus. (Prieto y Castro, 1998).

## **2.7 Vacunación.**

Las vacunas son productos formados con un microorganismo completo atenuado o inactivado, o fracciones de él, capaces de inducir una respuesta inmune protectora y duradera contra dicho microorganismo. Su función es prevenir y controlar futuras infecciones (López *et al*, 2004).



### 2.7.1 Vacunas atenuadas contra PRRS

La vacuna más utilizada contra el PRRSV utiliza virus activo modificado (MLV, por sus siglas en inglés), atenuado por pasaje múltiple en cultivo celular. En el caso del PRRSV, las vacunas atenuadas son más eficientes que las inactivadas debido a que inducen mayor respuesta celular y humoral; sin embargo, esta respuesta es insuficiente para proteger completamente contra la infección frente a virus heterólogos (Cano *et al.*, 2007, Royae *et al.*, 2004).

La vacunación de cerdos utilizando vacuna atenuada de tipo americano o europeo estimula la respuesta celular (Meier *et al.*, 2003, Royae *et al.*, 2004, Zuckermann *et al.*, 2007). Sin embargo, la proporción de células productoras de INF- $\gamma$  es muy baja (especialmente en cepas europeas) y su desarrollo muy lento si se compara con otras vacunas atenuadas como la del virus de Aujeszky, en la que la producción de células productoras de INF- $\gamma$  es de dos a cuatro veces mayor después de la vacunación (Meier *et al.*, 2003, Royae *et al.*, 2004, Zuckermann *et al.*, 2007). Por lo anterior, se afirma que la vacunación utilizando virus atenuados no es del todo eficiente, pues la respuesta celular medida por células productoras de INF- $\gamma$  tiene una evolución a partir del día 28 hasta el 42, en una proporción moderada pero significativa (Zuckermann *et al.*, 2007). En lo que respecta a la respuesta humoral que induce la vacuna de virus atenuado, los anticuerpos no neutralizantes aparecen en etapas tempranas de la infección y permanecen hasta por 96 semanas PI (Yoon *et al.*, 1996). Los AN sólo aparecen en algunos animales vacunados (Meier *et al.*, 2003); sin embargo, algunos autores detectaron AN después de desafiar a cerdos vacunados (Charerntantanakul *et al.*, 2006).

A pesar de lo anterior, varios experimentos han demostrado que el uso de la vacuna MLV reduce significativamente las lesiones y signos clínicos frente al desafío con cepas homólogas de PRRSV. Además, muestra una reducción en la proporción de cerdos infectados en forma persistente y en el tiempo de excreción viral utilizando cepas homólogas del virus vacunal (Cano *et al.*, 2007, Nodelijk, 2001). Sin embargo, es claro que la vacuna no previene la reinfección con cepas homólogas, sólo

disminuye los signos de la enfermedad. Frente a cepas heterólogas, se presenta el mismo escenario pero la protección es menor. Un problema importante relacionado con la seguridad de esta vacuna es el hecho de que en algunos casos, los virus atenuados pueden revertirse a virulencia y ocasionar la propagación del virus en la población porcina.

## **CAPÍTULO III**

### **HIPÓTESIS**

La circulación viral durante la etapa de maternidad, destete y engorda en granjas con esquemas de vacunación a PRRS es menor que en las que no tienen esquemas de vacunación.

### **OBJETIVO GENERAL**

Comparar la circulación viral en granjas porcinas con y sin esquema de vacunación a PRRSv.

## 2.8 REFERENCIAS

Albina E; Leforban Y; Baron T. and Vainner P. 1992. An enzyme linked immunosorbent (ELISA) for the detection of antibodies to the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Ann. Rech. Veterinary* 23(2):167-176.

Albina E., Carrat C, Charle B. 1998. Interferon-alpha response to swine arterivirus (PoAV), the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Interferon Cytokine Res*; 18:485-490.

Albina E., Piriou L., Hutet E., Cariolet R., L'hospitalier R. 1998. Immune responses in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet Immunol Immunopathol*; 61:49-66.

Arias, M., Barceló, J., Muñoz, A. y Sánchez-Vizcaíno, J.M. 2002. Curso de enfermedades infecciosas porcinas. (En línea). <http://www.sanidadanimal.info/cursos/curso/9/9-prrs.htm>

Batista, E. M., Meulenbergh, J. J. M., Choi, C. S., Molitor, T. W. 1996. Structural polypeptides of the American (VR-2332) strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch. Virol.* 141: 1357-1365.

Batista E.M., Molitor T.W. 1997. Cell-mediated immunity to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine. *Viral Immunol*; 10:83-94.

Beckenkamp G. 1985. Distribution pattern of the cellular oral immune system in the major and minor salivary glands, immunochemical findings. *HNO* 33:196-203.

Bender JS, Shen HG, Irwin CK, et al. 2010. Characterization of *Erysipelothrix* species isolates from clinically affected pigs, environmental samples, and vaccine strains from six recent swine erysipelas outbreaks in the United States. *Clin Vaccine Immunol* 17:1605-1611.

Bouma A., 2000. Transmissible virus disease in porcine reproduction. *Reproduction In Dom. Anim.* 35 (6): 243-246.

Brandtzaeg P. 1981. Transport models for secretory IgA and secretory IgM. *Clin Exp Immunol* 44:221-232.

Brandtzaeg P. 1989. Salivary immunoglobulins. In: *Human saliva: clinical chemistry and microbiology*. CRC press, Boca Raton. p. 1-51.

Cano, J.P., Dee, S.A., Murtaugh, M.P., Pijoan, C., 2007. Impact of a modified-live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine intervention on a population of pigs infected with a heterologous isolate. *Vaccine* 25, 4382–4391.

Challacombe S., Russell M, Hawkes J, E., Bergmeier, L.A., and Lehner T., 1978. Passage of immunoglobulins from plasma to the oral cavity in rhesus monkeys. *Immunol* 35:923-931.

Challacombe, S, Rahman D, O'Hagan D. 1997. Salivary, gut, vaginal and nasal antibody responses after oral immunization with biodegradable microparticles. *Vaccine* 15:169-175.

Cancel-Tirado S.M, Evans R.B., Yoon K.J. 2004. Monoclonal antibody analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus epitopes associated with antibody-dependent enhancement and neutralization of virus infection. *Vet Immunol Immunopathol*; 102:249-262.

Cano, J.P., Dee, S.A., Murtaugh, M.P., Trincado, C.A., Pijoan, C.B. 2007. Effect of vaccination with a modified-live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine on dynamics of homologous viral infection in pigs. *Am J Vet Res* ;68:565-571.

Cavanagh, D.1997. Nidovirales: A new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Arch. Virol.* 142: 629-633.

Corthier G. 1976. Swine fever: influence of passive immunity on pig immune response following vaccination with a live virus vaccine (Thiverval strain). *Ann Rech Vet* 7:361-372.

Corthier G, Aynaud J. 1977. Comparison of the immune response in serum and bucco-pharyngeal secretions following immunization by different routes with a live hog cholera virus vaccine Thiverval strain. *Ann Rech Vet* 8:159-165.

Costers S., Delputte P.L., Nauwynck H.J. 2006. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected alveolar macrophages contain no detectable levels of viral proteins in their plasma membrane and are protected against antibody-dependent, complement-mediated cell lysis. *J Gen Virol*; 87:2341-2351.

Charentantanakul W., Platt, R. Johnson W., Roof M., Vaughn E., Roth J.A. 2006. Immune responses and protection by vaccine and various vaccine adjuvant candidates to virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Immunol Immunopathol.*109:99-115.

Choi C., Cho W.S., Kim B., Chae C. 2002. Expression of Interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha in pigs experimentally infected with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV). *J Comp Pathol*; 127:106-113.

Crawford J, Taubman M, Smith D. 1975. Minor salivary glands as a major source of secretory immunoglobulin A in the human oral cavity. *Science* 190:1206-1209.

Done, S.H; Paton D. J; 1995. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) *Vet. Rec.* 136(14):32-35.

Duan, X. B., Nauwynck, H. J., Favoreel, H. W., Pensaert, M. B. 1998. Identification of a putative receptor for porcine reproductive and respiratory syndrome virus on alveolar macrophages. *J. Virol.* 72:4520-4523.

Flores-Mendoza L., Silva-Campa E., Resendiz M., Osorio F.A., Hernandez J.2008. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infects mature porcine dendritic cells and up-regulates interleukin-10 production. *Clin. Vaccine Immunol.*; 15:720-725.

Herschhorn A, Hizi A. 2010 Retroviral reverse transcriptases. *Cell Mol Life Sc.* 67: 2717-2747.

Hooper, S. A; White M. E. and Twiddy, N.1992 An out break of blue-eared pig disease (porcine reproductive and respiratory Syndrome) in four pig herds in Great Britain *Vet. Rec.* 131(7):140-144.

Joo H.S., Park B.K., Dee S.A., Piojan C. 1997 Indirect fluorescent IgM antibody response of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol*; 55:303-307.

Kittawornrat A, Prickett J, Chittick W, Wang C, Engle M, Johnson J, Patnayak D, Schwartz T, Whitney D, Olsen C, Schwartz K, Zimmerman J. 2010. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in serum and oral fluid samples from individual boars: will oral fluid replace serum for PRRSV surveillance? *Virus Res.* 154:170- 176.

Kittawornrat A, Prickett J, Wang C, Panyasing Y, Ballagi A, Rice A., Main R, Johnson J, Redemacher C, Hoogland M, Rowland R, Zimmerman J. 2012. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antibodies in oral fluid specimens using a commercial PRRSV serum antibody ELISA. J Vet Diagn Invest 24:262-269.

Kreutz, L. C., Ackermann, M. R. 1996. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus enters cells through a low pH dependent endocytic pathway. Virus Res. 42:137-147.

Langenhorst RJ, Lawson S, Kittawornrat A, Zimmerman JJ, Sun Z, Li Y, Christopher-Hennings J, Nelson EA, Fang Y. 2012. Development of a fluorescent microsphere immunoassay for detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus using oral fluid samples as an alternative to serum-based assays. Clin. Vaccine Immunol. 19:180–189

Lee S.M., Schommer S.K., Kleiboeker S.B. 2004. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus field isolates differ in *in vitro* interferon phenotypes. Vet Immunol Immunopathol; 102:217-31.

Loemba H.D, Mounir S., Mardassi H., Archambault D., Dea S. 1996. Kinetics of humoral immune response to the major structural proteins of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Arch Virol; 141:751-761.

López L., Domench N., Álvarez B, Ezquerro A, Domínguez J, Castro J.M.1999. Analysis of cellular immune response in pigs recovered from porcine respiratory and reproductive syndrome infection. Virus Res; 64:33-42.



Lopez-Fuertes L., Campos E., Domenech N., Ezquerro A., Castro J.M., Dominguez J. 2000. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus down-modulates TNF-alpha production in infected macrophages. *Virus Res*; 69:41-46.

López M., Pardo R., Vega M. 2004. Vacunas de nueva generación. *Genoma Esp, Salud Hum.* 7:12-15.

Meier W.A., Galeota J., Osorio F.A., Husmann R.J., Schnitzlein W.M., Zuckermann F.A. 2003. Gradual development of the interferon-gamma response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection or vaccination. *Virology*; 309:18-31.

Méndez T.A. 1996. Diagnóstico del síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino.

Mestecky J. 1987. The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions. *Ann N Y Acad Sci* 7:265-276.

Miller L.C., Laegreid W.W., Bono J.L., Chitko-Mckown C.G., Fox J.M. 2004. Interferon type I response in porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected MARC-145 cells. *Arch Virol*; 149:2453-2463.

Morrier J, Barsotti O. 1990. [Secretary IgA and the oral cavity: general review] IgA sécrétoire et cavité buccale: revue générale. *Actualités Odonto-Stomatologiques* 44:349-364.

Muhlenberg, J. J. M., Bos de Ruijter, J. N. A., Wensvoort, G., Moormann, R. J. M. 1998. Infectious transcripts from cloned genome-length cDNA of porcine reproductive respiratory syndrome virus. *J. Virol.* 72: 380-387.

Murtaugh M.P., Xiao Z., Zuckermann F. 2002. Immunological responses of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Viral Immunol.* 15:533-547.

Nair P, Schroeder H. 1986. Duct associated lymphoid tissues (DALT) of minor salivary glands and mucosal immunity. *Immunol* 57:171-180.

Nelson E.A, Christopher-Hennings J, Benfield D.A. 1994. Serum immune responses to the proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *J Vet Diagn Invest*; 6:410-15.

Neumann, E., Kleibenstein, J.B., Johnson, C.D., Mabry, J.W., Bush, E.J., Seitzinger, A.H., Zimmerman, J.J., 2005. An assessment of the economic impact of PRRS on swine production in the US. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 227, 385–392.

Nodelijk G., De Jong M.C., Van Leengoed L.A., Wensvoort G., Pol J.M., Steverink P.J. 2001. A quantitative assessment of the effectiveness of PRRSV vaccination in pigs under experimental conditions. *Vaccine*; 19:3636-3644.

Osorio F.A., Galeota J.A., Nelson E., Brodersen B., Doster A., Wills R. 2002. Passive transfer of virus-specific antibodies confers protection against reproductive failure induced by a virulent strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and establishes sterilizing immunity. *Virology* 2002; 302:9-20.

Plageman, PGW., Moenning, V. 1992 .Lactate dehydrogenase elevating virus, equine arteritis virus, and simian hemorrhage fever virus: anew group of positive strand RNA viruses. *Adv. Virus Res.* 41:90-102.

Pol, J.M., Van, A., Dijk J. K., Wensvoort, G. And Terpstra C. 1991. Pathological ultrastructural and immunohistochemical changes caused by Leystad virus in experimentally induced mystery swine disease (synonym: porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS). *Vet. Quart.* 13:137-143.

Prickett JR, Kim W, Simer R. 2008. Oral-fluid samples for surveillance of commercial growing pigs for porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 infections. *J Swine Health Prod.*; 16(2):86–91.

Prickett J, Simer R, Christopher-Hennings J, Yoon K-J, Evans RB, Zimmerman JJ. 2008b. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection using pen-based oral fluid samples: A longitudinal study under experimental conditions. *J Vet Diagn Invest* 20: 156-163.

Prickett JR, Zimmerman JJ. 2010. The development of oral fluid-based diagnostics and applications in veterinary medicine. *Anim Health Res Rev* 11:207-216.

Prieto C; Suarez P; Simarro Y; García C. Rillo S. M. and Castro J.M. 1997. Insemination of susceptible and preimmunized gilts with boar semen containing porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Theriogenology* 47:647-654.

Prieto C y Castro J. M. 1998a. Síndrome reproductivo y respiratorio porcino: aspectos más importantes de la enfermedad Parte1. *Anaporc* 175:1-15.

Prieto C. Castro J.M. 1998b. Síndrome reproductivo y respiratorio porcino: aspectos más importantes de la enfermedad Parte 4. *Anaporc* 178:49-77.

Ramirez A, Wang C, Prickett JR, et al. 2012. Efficient surveillance of pig populations using oral fluids. *Prev Vet Med* 104:292-300.

Royae, A.R., Husmann, R.J., Dawson, H.D., Calzada-Nova G, Schnitzlein W.M., Zuckermann, F.A. 2004. Deciphering the involvement of innate immune factors in the

development of the host response to PRRSV vaccination. *Vet Immunol Immunopathol*; 102:199-216.

Suarez, P. (2000). Ultrastructural pathogenesis of the PRRS virus. *Vet. Res.* 31:47-55.

Suradhat S, Thanawongnuwech R, Poovorawan Y. 2003. Upregulation of IL-10 gene expression in porcine peripheral blood mononuclear cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol*;84:453-459.

Swenson L. S; Hill H. T.; Zimmerman J.J; Evans L. E; Landgraf J. G; Wills R. W; Sanderson T. P; McGinley M. J; Brevik A. K; Ciszewski D. K and Frey M. L. 1994. Excretion of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen after experimentally induced infection in boars. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 204(12):1943-1948.

Torremorell, M., DVM, PhD, Leman Chair adaptado de What have we really learned from PRRS research? 2011; AASV Annual Meeting Proceedings, pp. 515-519

Terpstrac C; Wensvoort G; Pol J.M.A. 1991 Experimental reproduction of porcine endemic abortion and respiratory syndrome ( Mystery swine disease) by infection with Lelystad virus Koch's pstulates fulfilled. *Vet. Quart.* 13:131-136.

Van Reeth K., Labarque G., Nauwynck H, Pensaert M. 1999. Differential production of proinflammatory cytokines in the pig lung during different respiratory virus infections: correlations with pathogenicity. *Res Vet Sci*; 67:47-52.

Vicek J., Sen G. 1996. Interferons and other cytokines. In: FIELDS B, KNIPE D, HOWLEY P, editors. *Fields' Virology*. 3rd ed. Vol. 13. Philadelphia: Lippincott- Raven Publishers: 375-400.

Wang X., Eaton M., Mayer M., Li H., He D., Nelson E. A. 2007. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus productively infects monocyte-derived dendritic cells and compromises their antigen-presenting ability. *Arch Virol*; 152:289-303.

Weiland E., Wieczorek-Krohmer M., Kohl D., Conzelmann K.K., Weiland F. 1999. Monoclonal antibodies to the GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus are more effective in virus neutralization than monoclonal antibodies to the GP4. *Vet Microbiol*; 66:171-186.

Wensvoort, G., Terpstra C., Pol, J. M.A., Ter Laak, E.A., Bloemraad, M., De Kluyver, E. P., Kragten C. Van *Buiten, L.*, Den Besten, A., Wagenaar, F., Broekhuysen, J.M., Moonen, P. L. J. M., Zetstra, T., De Boer, E.A., Tibben, H.J., De Jong, M. F., Van't Weld, P., Groenland, G. J. R., Van Gennep, J. A., Voets, M.T., Verheijden, J. H. M. & Braamskamp, J. 1991. Mystery Swine Disease in the Netherlands: The Isolation of Lelystad Virus. *Vet. Quart.* 13, 121-130.

Xiao Z, Batista L, Dee S, Halbur P, Murtaugh MP. 2004. The level of virus-specific T-cell and macrophage recruitment in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in pigs is independent of virus load. *J Virol*; 78:5923-5933.

Yoon K.J., Zimmerman JJ, Swenson S.L, Mcginley M.J, Eernisse K.A, Brevik A. 1995. Characterization of the humoral immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection. *J Vet Diagn Invest* ; 7:305-312.

Yoon, K.J., Wu, L.L., Zimmerman, J.J., Hill, H.T., Platt, K.B. 1996. Antibody-dependent enhancement (ADE) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in pigs. *Viral Immunol*; 9:51-63.

Zimmerman, J., Yoon, K-J, Stevenson, G., Dee, S.A. 1998. The 1998 PRRS Compendium. Pp 1-128.

Zuckermann, F.A., Garcia, E.A., Luque, I.D., Christopher-Hennings, J., Doster, A., Brito, M. 2007. Assessment of the efficacy of commercial porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccines based on measurement of serologic response, frequency of gamma-IFN-producing cells and virological parameters of protection upon challenge. *Vet Microbiol*; 123:69-85.

[www.bi-vetmedica.com.mx/prrs/prrs.htm](http://www.bi-vetmedica.com.mx/prrs/prrs.htm) (Consultado Abril de 2013)

[www.porcicultura.com](http://www.porcicultura.com) (Consultado Abril de 2013)

[www.sagarpa.gob.mx](http://www.sagarpa.gob.mx) (Consultado Marzo de 2013)

[www.sanidadanimal.info/cursos/curso/9/9-prrs.htm](http://www.sanidadanimal.info/cursos/curso/9/9-prrs.htm) (Consultado abril de 2014)

[www.siap.gob.mx](http://www.siap.gob.mx) (Consultado Marzo de 2013)

[www.3tres3.com](http://www.3tres3.com) (Consultado abril de 2015)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21

## **CAPÍTULO IV**

### **CIRCULACIÓN Y RESPUESTA HUMORAL DEL VIRUS DE PRRS EN GRANJAS PORCINAS POSITIVAS, CON Y SIN VACUNACIÓN EN YUCATÁN, MÉXICO.**

### **PRRS VIRUS CIRCULATION AND HUMORAL RESPONSE IN TWO POSITIVE PIG FARMS WITH AND WHITOUT VACCINATION IN YUCATAN, MÉXICO.**

Diana Carolina Sáez Peniche\*, Alejandro Alzina López\*, Edwin José Gutiérrez Ruiz\*, Jorge Carlos Rodríguez Buenfil\*

\*Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Autónoma de Yucatán. Km 15.5 carretera Mérida-Xmatkuil, Apartado postal 4-116, Mérida Yucatán, México.

AUTOR RESPONSABLE: Diana Carolina Sáez Peniche. Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Autónoma de Yucatán. Km 15.5 carretera Mérida-Xmatkuil, Apartado postal 4-116, Mérida Yucatán, México. Tel. 9423200 ext. \_\_. E-mail: mvzsaez@hotmail.com

1 **RESUMEN**

2 Se realizó un estudio prospectivo transversal descriptivo por conveniencia en 2 granjas porcinas  
3 con historial positivo al virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSv), con y  
4 sin esquemas de vacunación con el objetivo de comparar la circulación viral en las áreas de  
5 maternidad, destete y engorda en ambas granjas. En cada granja fueron colectadas muestras de  
6 fluidos orales semanalmente durante el transcurso de un mes y medio (diciembre de 2013 a  
7 febrero de 2014) con un total de 6 muestreos. Durante cada colecta, las muestras fueron  
8 obtenidas de las áreas de maternidad (n=4), destete (n=2) y engorda (n=2), obteniendo un total  
9 de 48 muestras por granja.

10 A cada muestra se le realizó una prueba de ELISA para la detección de anticuerpos IgG y RT-  
11 PCR tiempo real para la detección de ácido nucleico viral.

12 En la granja A se encontraron valores S/P elevados en el área de maternidad (5.42),  
13 disminuyendo en el área de destete (1.67), hasta ser negativos en la etapa de engorda(0.037).  
14 Mientras que en la granja B, solo en el área de maternidad se encontraron casos positivos (1.75)  
15 observando una diferencia estadísticamente significativa ( $p<0.05$ ). En la prueba de RT-PCR  
16 tiempo real no se detectó la presencia de antígeno viral. Se concluye que en el presente estudio  
17 no hubo circulación viral durante el periodo de evaluación, o no fue posible detectarla con el  
18 tamaño de muestra utilizado.

19

20 Palabras clave: Síndrome respiratorio reproductivo porcino, fluidos orales, ELISA, RT-PCR  
21 tiempo real

22



1 **ABSTRACT**

2

3 A convenience descriptive cross sectional study was carried out in two swine farms with history  
4 of the presence of the pig reproductive and respiratory virus (PRRSv), with and without the use  
5 of vaccination against the virus, with the objective to compare virus circulation in maternity,  
6 weaning and fattening areas in both farms. On each farm oral fluid samples were collected  
7 weekly for six weeks (december 2013 to February 2014) a total six samples. During each  
8 collection, samples were obtained from maternity (n=4), weaning (n=2) and Fattening (n=2)  
9 areas, making a total of 48 samples each farm.

10 Each sample was run using an ELISA test for the detection of IgG antibodies and Real time RT-  
11 PCR for the detection of viral nucleic acids.

12 On farm A, high S/P values were detected in the maternity area (5.42), decreasing in the  
13 weaning area (1.67), to become negative in the fattening area (0.037). While on farm B, there  
14 were positive results only in the maternity area (1.75) with an statistically significant difference  
15 ( $p < 0.05$ ). In the real time RT-PCR the presence of viral nucleic acid was no achieved. It is  
16 concluded that in both farms there was no virus circulation during the time of the study or it  
17 was not detected with the sample size used.

18

19 Key words: PRRS, oral fluid, ELISA, Real time RT-PCR, virus circulation

20

21

22

23

24

## 1 1.- INTRODUCCIÓN

2 El Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS, por sus siglas en inglés) es una  
3 enfermedad que se caracteriza por la presencia de abortos, reducción en la ganancia de peso,  
4 patologías respiratorias en los lechones y aumento de la mortalidad en las piaras afectadas. Fue  
5 descrito por primera vez en 1987 en Carolina del Norte, en los Estados Unidos de Norteamérica  
6 (Zimmerman *et al.*, 1998).

7 El PRRS es causado por un arterivirus, que presenta una gran variabilidad genética y  
8 antigénica, existiendo grandes diferencias entre los aislamientos europeos y americanos lo que  
9 limita la eficacia de las vacunas actuales (Arias M. *et al*, 2008). Otros miembros de este grupo  
10 incluyen el virus de la arteritis equina, el virus de la deshidrogenasa láctica del ratón y el virus de la  
11 fiebre hemorrágica del simio (Plageman *et al.*, 1992, Cavanagh, 1997).

12 En la actualidad el diagnóstico del virus del PRRS (PRRSv) es posible mediante la  
13 identificación de virus viables, antígenos virales, ácidos nucleicos y anticuerpos IgG circulantes  
14 (Arias, M. *et al*, 2002). Durante estos últimos años, se han desarrollado y validado nuevas  
15 herramientas de muestreo, monitoreo y diagnóstico en los cerdos, que resultan más rápidas,  
16 sencillas y menos costosas. Una de estas técnicas es la obtención y el uso de fluidos orales como  
17 espécimen para diagnóstico en porcinos. Esta técnica ya ha sido validada experimentalmente para  
18 PRRSv, circovirus porcino tipo 2(PCV2) e influenza (Prickett *et al.* 2008).

19 El objetivo del presente estudio fue **detectar** y comparar la circulación viral en el área de  
20 maternidad, destete y engorda en granjas porcinas con y sin esquema de vacunación a PRRSv.

21

## 1 2.- MATERIALES Y MÉTODOS

### 2 2.1 Lugar de estudio

3 El estudio se realizó en dos granjas en el Estado de Yucatán, México, localizado al sureste de  
4 México, ubicado en las coordenadas son 20° 58' 04" N, 89° 37' 18" O. Al este colinda con el  
5 Estado de Quintana Roo, al oeste con el Estado de Campeche y al norte con Golfo de México  
6 ([www.merida.gob.mx](http://www.merida.gob.mx)).

7 Las granjas fueron identificadas como granja A y granja B. La primera se encuentra  
8 ubicada, en la región litoral centro norte del estado, a unos 40 km al oriente de Mérida. La granja B  
9 se encuentra, al noroeste del estado, a 25 km al norte de Mérida.

### 10 **2.2 Población de referencia.**

11 Las unidades de estudio fueron seleccionadas por conveniencia, con una producción de  
12 ciclo completo, multisitios, la granja A tiene una población de 930 vientres, mientras que la granja  
13 B cuenta con 500 vientres. El destete se realiza a los 21 días de edad en ambas granjas, la granja A  
14 cuenta con esquema de vacunación contra PRRSv, la vacuna se aplica al destete, y a las cerdas  
15 reproductoras cada cuatro meses en sabana con la vacuna comercial Ingelvac® PRRS MLV  
16 (laboratorios Boehringer Ingelheim) a dosis de 2 ml vía IM, en la granja B no se vacuna contra  
17 PRRSv. Ambas unidades cuentan con programas de bioseguridad, así como de limpieza y  
18 desinfección y con programas de vacunación y medicación para las enfermedades presentes en cada  
19 unidad. El personal es exclusivo de cada área. La reproducción se lleva a cabo por medio de  
20 inseminación artificial con semen proveniente de centros de transferencia genética (CTG) libre de  
21 PRRSv y con una tasa de desecho anual promedio del 35 % de los vientres. Ambas granjas utilizan  
22 autorreemplazos. La alimentación es con alimento balanceado comercial.

### 1 **2.3 Diseño de estudio**

2 Se realizó un estudio prospectivo transversal por conveniencia. El tamaño de la muestra se  
3 determinó utilizando el programa de computo WinEpiScope 2.0, con un nivel de confianza del 95%,  
4 considerando una prevalencia del virus de PRRS del 5% en la granja A y de 10% para la granja B y  
5 una diferencia en la circulación viral por etapa del 60% en maternidad, 40% en destete y del 20% en  
6 engorda.

7 El experimento constó de un total de 6 muestreos por granja, a intervalos semanales. Cada  
8 muestreo tuvo un total de 8 muestras, 4 correspondientes a lechones, 2 a de destetes y 2 a engorda.

### 9 **2.4 Obtención de muestras**

10 Las muestras de fluido oral se colectaron colocando una soga 100% de algodón, sin  
11 blanqueador, de 5/8" suspendida a una altura aproximada al hombro de los cerdos, por un tiempo  
12 aproximado de 30 minutos, calculando que un 80% de los animales la muerde (Prickett, 2008), en  
13 cada corraleta habían 14 cerdos en promedio.

14 Posteriormente se procedió a retirar la cuerda y colectar la muestra exprimiendo la soga de  
15 manera manual dentro de una bolsa nueva de plástico ziploc®, se colocó la muestra en tubos de  
16 plástico estériles y fueron centrifugados a 3,300G por 10 minutos con la finalidad de que las  
17 partículas contaminantes (alimento, heces, etc.) se precipiten, después se colocó 1.5 ml del  
18 sobrenadante en cada uno de 2 viales, uno para las pruebas de ELISA, que se conservaron a -80° C  
19 y el otro para PCR conservados a -20° C hasta el momento de correr las pruebas.

### 20 **2.5 Análisis de laboratorio**

21 Las pruebas diagnósticas se llevaron a cabo en el laboratorio de Inmunología De La  
22 Unidad de Diagnóstico de la FMVZ- UADY.

1     **2.6 Detección de anticuerpos**

2             Para la detección de anticuerpos específicos al virus de PRRS se realizó una prueba de  
3     ELISA, utilizando el kit comercial de laboratorios IDEXX específica para fluidos orales (IDEXX  
4     PRRS OF); siguiendo el protocolo indicado por el fabricante y tomando como punto de corte  
5     valores  $S/P \geq 0.40$ . La prueba dispone del 96% sensibilidad y 99.6% de especificidad.

6     **2.7 Detección de ácidos nucleicos virales**

7     **2.7.1 Extracción de RNA viral**

8             La extracción de RNA de las muestras de fluidos y de la vacuna comercial se llevó a cabo  
9     utilizando el kit comercial QIAamp® cador® Pathogen de laboratorios QIAGEN®. El protocolo se  
10    llevó a cabo de acuerdo a las indicaciones del fabricante. El ARN obtenido se almacenó a  $-20^{\circ} \text{C}$   
11    hasta el momento de su uso.

12    **2.7.2 RT-PCR en Tiempo Real**

13            La prueba de RT-PCR en tiempo real se realizó utilizando el kit comercial virotype®  
14    PRRSV RT-PCR de laboratorios QIAGEN®. El protocolo se llevó a cabo de acuerdo a las  
15    indicaciones del fabricante.

16

17

1 **3.- RESULTADOS**

2 **3.1 Detección de anticuerpos**

3 En la prueba de ELISA se observó que todas las muestras de fluidos orales (FO) de los  
4 lechones en el área de maternidad, mostraron valores de S/P positivos para las granjas A y B.  
5 Encontrando los valores en la granja A más elevados en comparación con los obtenidos en la  
6 granja B (cuadro 1).

7 El 91.66 % (11/12) de las muestras en el área de destete en la granja A, resultaron positivas  
8 a la prueba; no obstante, los valores S/P disminuyeron, mientras que en la granja B todas las  
9 muestras presentaron valores negativos para esta etapa.

10 El 100% de las muestras de FO colectadas del área de engorda resultaron negativas para  
11 PRRSv en ambas granjas (A y B).

12 Al realizar la prueba de T de student comparando los valores S/P de las pruebas de ELISA  
13 de ambas granjas, se observó una diferencia estadísticamente significativa con una probabilidad  
14 menor a 0.0006.

15

16

17

18

19

1 **Cuadro 1.- Porcentaje de muestras de fluido oral positivas a anticuerpos contra el virus de**  
 2 **PRRS en la prueba de ELISA y promedios de valores S/P por muestreo en granjas**  
 3 **porcinas del Estado de Yucatán con y sin esquema de vacunación contra el virus de**  
 4 **PRRS.**

| Muestreos                          | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    |
|------------------------------------|------|------|------|------|------|------|
| Porcentaje +<br>Granja A           | 75   | 75   | 62.5 | 75   | 75   | 75   |
| Porcentaje +<br>Granja B           | 0    | 25   | 50   | 50   | 50   | 50   |
| Promedio valor<br>S/P Granja A     | 3.04 | 3.53 | 6.21 | 4.53 | 5.37 | 3.35 |
| Promedio valor<br>S/P Granja B     | 0    | 5.17 | 2.04 | 1.87 | 1.91 | 2.07 |
| Desviación<br>Estándar<br>Granja A | 2.26 | 3.19 | 3.02 | 2.11 | 2.00 | 1.72 |
| Desviación<br>Estándar<br>Granja B | 0    | 0.55 | 0.52 | 0.54 | 0.93 | 0.63 |

19 Se aplicó estadística descriptiva a los valores S/P obtenidos en la prueba de ELISA en  
 20 fluidos orales, obteniendo una media de 3.143 en la granja A y 0.892 en la granja B, error típico de  
 21 0.413 y 0.193 para la granja A y B respectivamente, una mediana de 2.792 en la granja A y de  
 22 0.054 en la granja B, en moda se obtuvieron valores de 0.002 para la granja A y de 0 para la granja

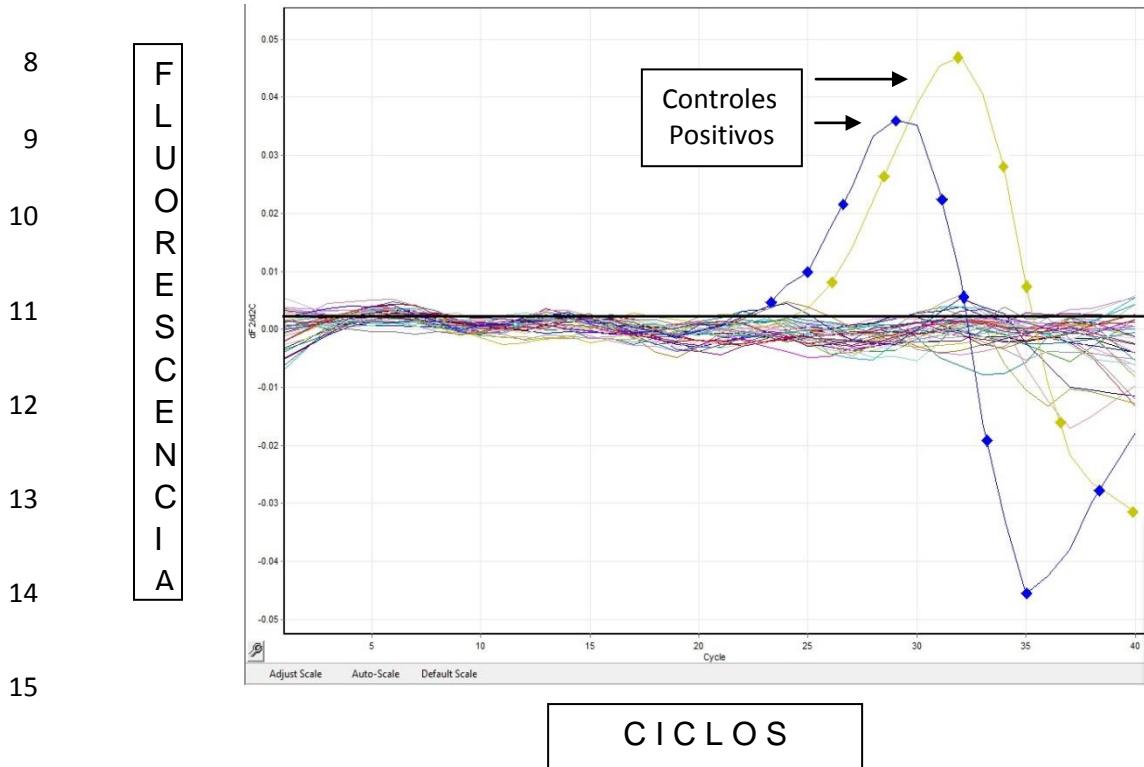
1 B, la desviación estándar para la granja A fue de 2.861 y de 1.335 en la granja B, utilizando un  
2 nivel de confianza del 95%.

3

### 4 3.2 RT-PCR tiempo real

5 En la prueba de RT-PCR tiempo real todas las muestras colectadas arrojaron resultados negativos  
6 para ambas granjas.

7



17 **Figura 1.- Resultados de RT-PCR tiempo real para muestras de fluido oral obtenidas de dos**  
18 **granjas multisitios del estado de Yucatán, una con y otra sin esquema de vacunación contra el**  
19 **virus de PRRS.**

20



#### 1 **4.- DISCUSIÓN**

2 Los resultados obtenidos en las pruebas de ELISA, para el área de maternidad de la granja  
3 A fueron positivos; se argumenta que puede deberse a la inmunidad pasiva transmitida por las  
4 cerdas a los lechones mediante el calostro. El estatus sanitario de las granjas en estudio fue  
5 reportado como positivo al virus de PRRS; no obstante, la variabilidad de los valores obtenidos  
6 oscilaron entre 0.485 a 8.86 en esta granja, la presencia de anticuerpos probablemente fue causado  
7 por la aplicación de la vacuna Ingelvac® PRRS MLV (cepa ATCC-VR-2332 con una  
8 concentración de  $10^{4-9}$ ), otro hecho que puede explicar la presencia de anticuerpos en los lechones  
9 es que se les proporciona alimento pre-iniciadorcomercial (Nupig®) a partir del quinto día de vida.  
10 Uno de los ingredientes principales de este alimento es el plasma sanguíneo de cerdo, en  
11 investigaciones reportadas se ha comprobado la presencia de inmunoglobulinas G (IgG) frente al  
12 virus de PRRS en estos alimentos (Johnson y Zimmerman, 2012). Los resultados positivos  
13 encontrados en los cerdos del área de maternidad de la granja B, probablemente fueron causados  
14 por el empleo de este tipo de alimento pre-iniciadores que también se usa en esta granja, la ausencia  
15 de anticuerpos maternos en esta granja probablemente ayuda a entender los niveles más bajos de  
16 anticuerpos en los lechones de la granja B comparados con los de la granja A. Solamente se  
17 obtuvieron resultados positivos en la etapa de destete de la granja A, esto puede explicarse porque  
18 la inmunidad materna, solo presente en esta granja, comienza a descender entre la semana 4 y 6  
19 posterior al nacimiento, lo que concuerda con valores S/P menores que los correspondientes a la  
20 etapa de maternidad.

21 Con respecto al área de engorda, las muestras de ambas granjas, arrojaron resultados  
22 negativos, esto significa que no se detectó circulación viral debido a inexistencia de la misma o a  
23 que la presencia y circulación del virus se encuentra en valores más bajos que los utilizados para  
24 determinar los tamaños de muestra.

1            Los resultados encontrados indican que no existe circulación del virus de PRRS igual o  
2 mayor al 5% en las granjas estudiadas y considerando que el virus a pesar de ser de baja  
3 contagiosidad es altamente infeccioso y normalmente infecta porcentajes mayores del 5% de los  
4 animales en las granjas positivas, es probable que las granjas estudiadas estén libres de PRRS.

5            La baja o nula circulación del virus de PRRS evidenciados en los resultados obtenidos en  
6 este estudio, pueden deberse a que las medidas de bioseguridad han limitado la transmisión del virus  
7 hacia animales susceptibles, como por ejemplo la utilización de arcos, vados, y tapetes sanitarios,  
8 granjas multisitios, lavado y desinfección de las instalaciones, cerrado de granja, entre otras, debido  
9 a la particularidad del virus de ser poco contagioso (Arias, 2002).

10           Debido a que las granjas se localizan en una zona endémica del virus de PRRS, es  
11 importante considerar la posibilidad de que exista la reinfección de las granjas con virus de campo,  
12 principalmente por cepas variantes, lo que podría ocasionar brotes de la enfermedad, con mayor  
13 severidad en aquellas poblaciones totalmente susceptibles al virus, como las de las granjas donde no  
14 se aplica vacuna contra este virus.

15           En los resultados de RT-PCR en tiempo real, no se encontró ningún resultado positivo, lo  
16 que apoya los resultados de la prueba de ELISA para las dos granjas en estudio.

17           Considerando la dinámica del virus de PRRS en las granjas porcina, se puede deducir que  
18 para el monitoreo de la circulación viral es necesario realizar los dos tipos de prueba empleados en  
19 el presente estudio. La serología permite determinar si los animales han tenido contacto con el virus  
20 y esta respuesta es detectable durante periodos de tiempo más largos (se detectan anticuerpos IgG  
21 entre los días siete y diez PI, con incremento entre la segunda y cuarta semanas, siendo detectables  
22 hasta 300 días PI a niveles bajos (Nelson *et al.*, 1994). que la presencia en si del virus en diferentes  
23 fluidos como sangre (6-8 semanas) (Loemba *et al.*, 1996) o fluidos orales (42 dPI) (Arias *et al.*,

1 2002), en los cuales suele emplearse la prueba de PCR, sin embargo, en caso de tener un resultado  
2 positivo, la especificidad de la prueba de RT-PCR da certeza de que el agente esté presente en una  
3 granja.

4

5

## 6 **5.- Conclusión**

7 No se detectó circulación del virus de PRRS en ninguna de las áreas en las granjas con y sin  
8 esquemas de vacunación contra PRRS incluidas en este estudio, lo que indica que en caso de estar  
9 presente en las granjas este tiene una prevalencia menor al 5%.

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

1   **REFERENCIAS**

2   Arias, M., Barceló, J., Muñoz, A. y Sánchez-Vizcaíno, J.M. 2002. Curso de enfermedades  
3   infecciosas porcinas. (En línea). <http://www.sanidadanimal.info/cursos/curso/9/9-prrs.htm>

4   Cavanagh, D. (1997). Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. Arch.  
5   Virolog. 142: 629-633.

6   IDEXX PRRS OF test kit Handbook. USA 2013.

7

8   Johnson JK, Main R, Zimmerman J. 2012. Exogenous sources of PRRSV antibody detectable in the  
9   PRRSV oral fluid ELISA. J Swine Health Prod (in press).

10

11   Loemba H.D, Mounir S., Mardassi H, Archambault D., Dea S. 1996. Kinetics of humoral immune  
12   response to the major structural proteins of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus.  
13   Arch virol; 141:751-761.

14

15   McCaw MB. 2003. McREBEL management. In: Zimmerman J, Yoon K-J (editors). The PRRS  
16   compendium (2nd edition). National pork board, Des Moines, Iowa. pp. 131–135.

17

18   Nelson E.A., Christopher-Hennings J, Benfield Da. 1994. Serum immune responses to the proteins  
19   of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. J Vet Diagn Invest; 6:410-15.

20

21

1 Neumann, E., Kleibenstein, J.B., Johnson, C.D., Mabry, J.W., Bush, E.J., Seitzinger, A.H.,  
2 Zimmerman, J.J., 2005. An assessment of the economic impact of PRRS on swine production in the  
3 US. J. Am. Vet. Med. Assoc. 227, 385–392.

4

5 Plageman, PGW., Moenning, V. 1992 .Lactate dehydrogenase elevating virus, equine arteritis virus,  
6 and simian hemorrhage fever virus: anew group of positive strand RNA viruses. Adv. Virus Res.  
7 41:90-102.

8

9 Polson D, Hrtsook G, Dion K. McRebel is a Key component for the successful elimination of PRRS  
10 virus from very large swine breeding herds. Int. Pig. Vet. Soc. Cong; 2010. P 267

11 Prickett JR, Kim W, Simer R, et al. Oral-fluid samples for surveillance of commercial growing pigs  
12 for porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 infections. J  
13 Swine Health Prod. 2008; 16(2):86–91.

14 QIAamp® cadore® Pathogen kit Mini Handbook. USA 2012.

15

16 Torremorell, M., DVM, PhD, Leman Chair adaptado de *What have we really learned from PRRS*  
17 *research?* 2011; AASV Annual Meeting Proceedings, pp. 515-519.

18

19 Virotype® PRRSV RT-PCR kit Handbook. USA 2013.

20

21

22

23

- 1 Wensvoort, G., Terpstra C., Pol, J. M.A., Ter Laak, E.A.,Bloemraad, M., De Kluyver, E. P.,
- 2 Kragten C.Van *Buiten, L.*,Den Besten, A., Wagenaar, F., Broekhuhsen, J.M., Moonen, P. L. J. M.,
- 3 Zetstra, T., De Boer, E.A., Tibben, H.J., De Jong, M. F., Van't Weld, P., Groenland, G. J. R., Van
- 4 Gennep, J. A., Voets, M.T., Verheijden, J. H. M. & Braamskamp, J. 1991. Mystery Swine Disease
- 5 in the Netherlands: The Isolation of Lelystad Virus. *Vet. Quart.* 13, 121-130.
- 6
- 7 Win Episcopo 2.0 (programa de cómputo) University of Edinburgh.