

MEDIDAS DE MANEJO DEL SÍNDROME REPRODUCTOR Y RESPIRATORIO PORCINO (PRRS) BASADAS EN SU DIAGNOSTICO MOLECULAR PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME (PRRS)

D. Kukielka Zunzunegui y J.M. Sánchez-Vizcaíno Rodríguez

Departamento de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid

Resumen

El síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRS) es una de las enfermedades infecciosas más importantes por el impacto económico que supone para la industria porcina nacional e internacional.

Está producida por un virus ARN cuyas principales características son la variabilidad genética y antigénica, sus propiedades inmunomoduladoras y su capacidad para inducir infecciones persistentes. Han sido descritos dos genotipos principales del virus de PRRS, el europeo (EU) y el americano (NA) y últimamente, un tercer genotipo presente solo en Asia. La comparación de sus secuencias ha mostrado diferencias genéticas significativas entre ellos, lo que contribuye a que la vacunación sea poco efectiva. Uno de los métodos más empleados para el diagnóstico de PRRS es la RT-PCR que, acompañada de secuenciación, nos permite determinar el genotipo viral. En los últimos años se han empezado a desarrollar nuevas técnicas de RT-PCR en tiempo real que suponen una mejora sobre las convencionales debido a que presentan ventajas como su mayor sensibilidad, la posibilidad de cuantificar la carga viral o el ahorro de tiempo y material, mejorando el control de la enfermedad.

En este trabajo queremos hacer patentes las ventajas y aplicaciones de la RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico y el control del virus del Síndrome Respiratorio y Reproductor Porcino.

Palabras clave: PRRS, RT-PCR, diagnóstico.

Abstract

The porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is one of the most important infectious diseases in swine national and international industry because of its economic impact.

It is caused by a single stranded RNA virus which its main characteristics are: genetic and antigenic variability, immune modulation properties and its capacity to produce persistent infections.

There have been described two main genotypes, the North American (NA) and the European (EU) and lately, a third one still limited to Asia. The comparison of its sequences has shown important genetic differences between them, what contributes to the failure of the existing vaccines against it. One of the most used diagnostic methods is the RT-PCR which complemented with sequencing, leads to determinate the viral genotype. In the last years, new RT-PCRs in real time have been developed because they present advantages as higher sensitivity, quantification of viral load or saving on material and time, improving the control of the disease.

In this job, we would like to show the advantages and applications of the real time RT-PCR for the diagnostic and control of the PRRS virus.

Key words: PRRS, RT-PCR, diagnostic.

Introducción

El Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS) es una de las enfermedades infecciosas más importantes por el impacto económico que supone para la industria porcina nacional e internacional (Albina, 1997)

Fue descrito por primera vez en 1987 en EEUU y posteriormente se detectó en Europa en 1990. El agente causante de PRRS es un virus (PRRSV) con envoltura perteneciente al Género *Arterivirus*. Su genoma consta de RNA de cadena sencilla, de aproximadamente 15kb y contiene ocho genes u ORF (Open Reading Frame o Marcos de Lectura Abierta). ORF1a y 1b ocupan la mayor parte del genoma de PRRSV y codifican la polimerasa viral; ORF 2a, 3, 4 y 5 codifican cuatro glicoproteínas que forman parte de la membrana del virus; ORF 2b y 6 codifican proteínas de membrana no glicosiladas y ORF 7 contiene la proteína de la nucleocápside (N) (Zimmerman et al., 1997).

Han sido descritas dos variantes del PRRSV presentes en EEUU (variante VR 2332, [U87392](#)) y en Europa (Lelystad, LV, [M96262](#)) cuyas secuencias genómicas difieren en 50-70%. En los últimos años, ha sido descrita la variante china, de mayor patogenicidad que las otras. La variabilidad en la secuencia de nucleótidos no se da por igual en todos los genes, sino que en algunos de éstos se acumulan la mayoría de los cambios que diferencian unas cepas de otras. Es el caso de los ORFs 5 y 7. El ORF 7, al ser el gen que codifica la proteína de la nucleocápside, es el más conservado y por lo tanto se emplea como diana en los test diagnósticos basados en RT-PCR, permitiendo una detección de variantes mas amplia que el ORF 5 que, debido a que esta en la membrana del virus, sufre mayor presión de selección,

siendo altamente variable. El ORF 5 es empleado para analizar la variabilidad genética de las poblaciones virales y establecer relaciones filogenéticas (Andreyev et al., 1997)

La presencia en una misma explotación porcina de más de una cepa de PRRSV hace que las vacunas que existen en el mercado confieran una protección parcial. Este hecho, junto con la elevada capacidad de infección y transmisión y la tendencia de PRRSV de permanecer latente de manera indefinida hacen necesaria la aplicación de técnicas de detección temprana y de manejo de la explotación para evitar la propagación del virus.

El objetivo de este trabajo es conocer la variabilidad genética y antigénica de los distintos tipos de virus existentes en la granja y desarrollar un modelo de manejo que permita mantener la enfermedad controlada, para ello, empleamos técnicas diagnósticas basadas en RT-PCR en tiempo real. El diagnóstico va seguido de la secuenciación de positivos para determinar la cepa predominante que posteriormente será inoculada a los animales antes de entrar al ciclo productivo de la granja correspondiente. Con ello se uniformizan las poblaciones virales y se genera una respuesta inmune homogénea frente al virus predominante, paso previo a una inmunización generalizada y a una posible erradicación de la enfermedad.

Material y métodos

El trabajo se realizó en una granja localizada en Segovia que presentaba casos de PRRS y no vacunaba. El número de muestras analizadas fueron 300 sueros de lechones y reproductoras.

Se detectaron las variantes genéticas presentes en la granja mediante el empleo una RT-PCR en tiempo real que amplifica el ORF 7 del virus. Esta técnica permite realizar un diagnóstico más rápido y, lo más importante, mediante la elaboración de una curva estándar, permite cuantificar la carga viral presente en la muestra.

La extracción de ARN viral se llevo a cabo mediante el empleo del kit comercial Nucleospin RNA virus (Macherey-Nagel), del que se obtiene un volumen final de 50 μ L.

La RT-PCR se llevo a cabo en un volumen final de 25 μ L que contenían: 12,5 μ L de master mix (Stratagene), 2 μ L de primers (Donadeu et al. 1997), 0,0625 μ L de RT/inhibidor de RNAsas (Stratagene), 3 μ L de RNA inicial y agua hasta completar el volumen final. El programa de termociclador consistió en: 30 min. A 48°C (retrotranscripción), 10 min. a 95°C, seguidos de 40 ciclos de 30 seg. a 95°C y 1 min. a 60°C seguidos de 7 min. a 72°C y acabando con la elaboración de la curva de disociación necesaria en el caso de empleo de SYBR GREEN como molécula emisora de fluorescencia.

Una vez detectadas como positivas las muestras, se procedió a hacer una RT-PCR convencional para detectar el ORF 5 (Oleksiewicz et al. 1998)

La RT-PCR convencional se llevó a cabo en un volumen final de 25 μ L que contenían: 7 μ L de ARN inicial, 0,0625 μ L de RT (Ambion), 0,125 de Taq polimerasa (Applied Biosystems) con su correspondiente Buffer y Cloruro Magnésico (2,5 μ L), 0,5 μ L de dNTPs, 0,5 μ L de primer ORF5 PRRS reverse y forward, 0,125 μ L de inhibidor de RNAsas y agua hasta completar el volumen final. El programa de termociclador consistió en: 30 min. A 48°C (retrotranscripción), 10 min. a 95°C, seguidos de 40 ciclos de 30 seg. a 95°C, 30 seg. a 55°C y 30 seg. a 72, seguidos de 7 min. a 72°C, acabando la reacción a 4 °C.

Posteriormente se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 2% para observar si existe amplificación del ARN viral.

Las muestras positivas se secuenciaron para identificar la variante exacta a la que pertenecen los aislados.

La carga viral fue determinada tomando como referencia una curva estándar elaborada a partir de diluciones seriadas de un plásmido de concentración conocida que contenía el fragmento viral de interés.

Una vez inmunizados los animales de la reposición (200 hembras), se procedió a la realización periódica de ELISAs frente a anticuerpos para evaluar la inmunidad generada como consecuencia de las inmunizaciones.

Resultados

Con la RT-PCR en tiempo real se obtuvieron 20 animales positivos en la misma explotación:

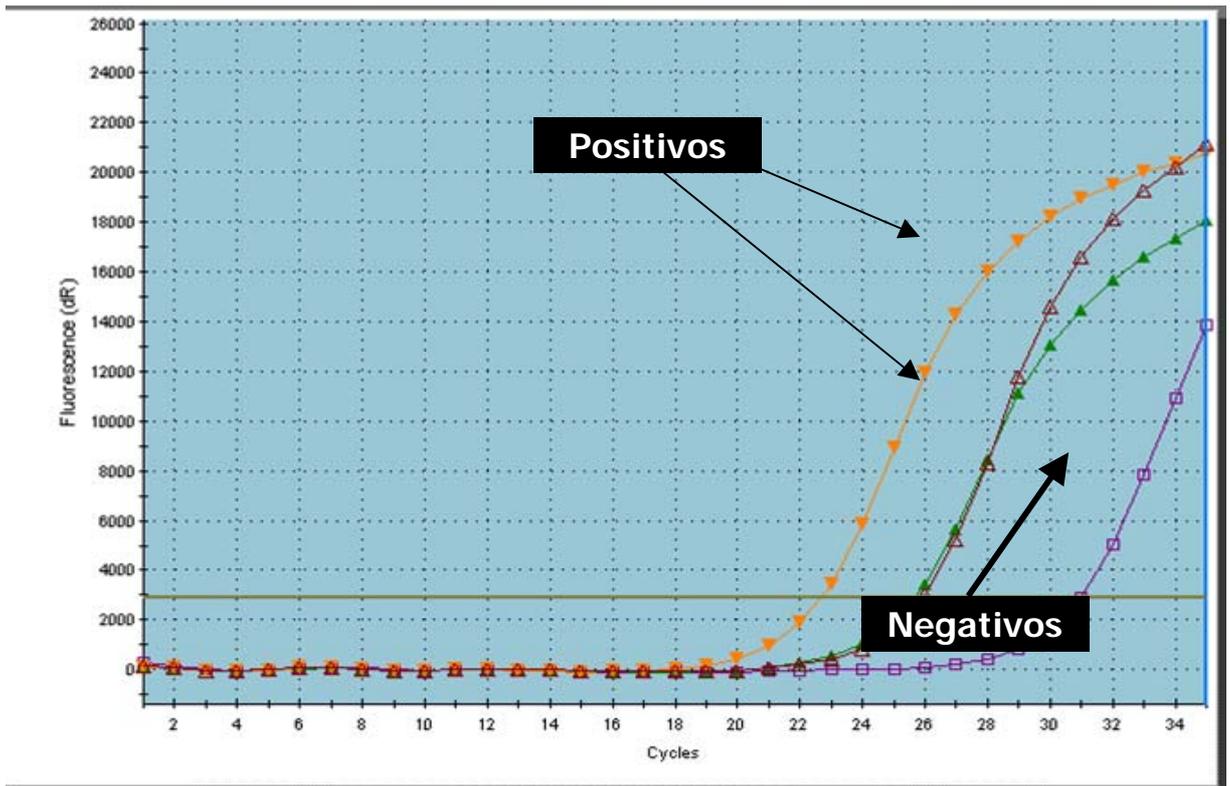


Fig.1. Curva de amplificación en real time RT-PCR con SYBR Green.

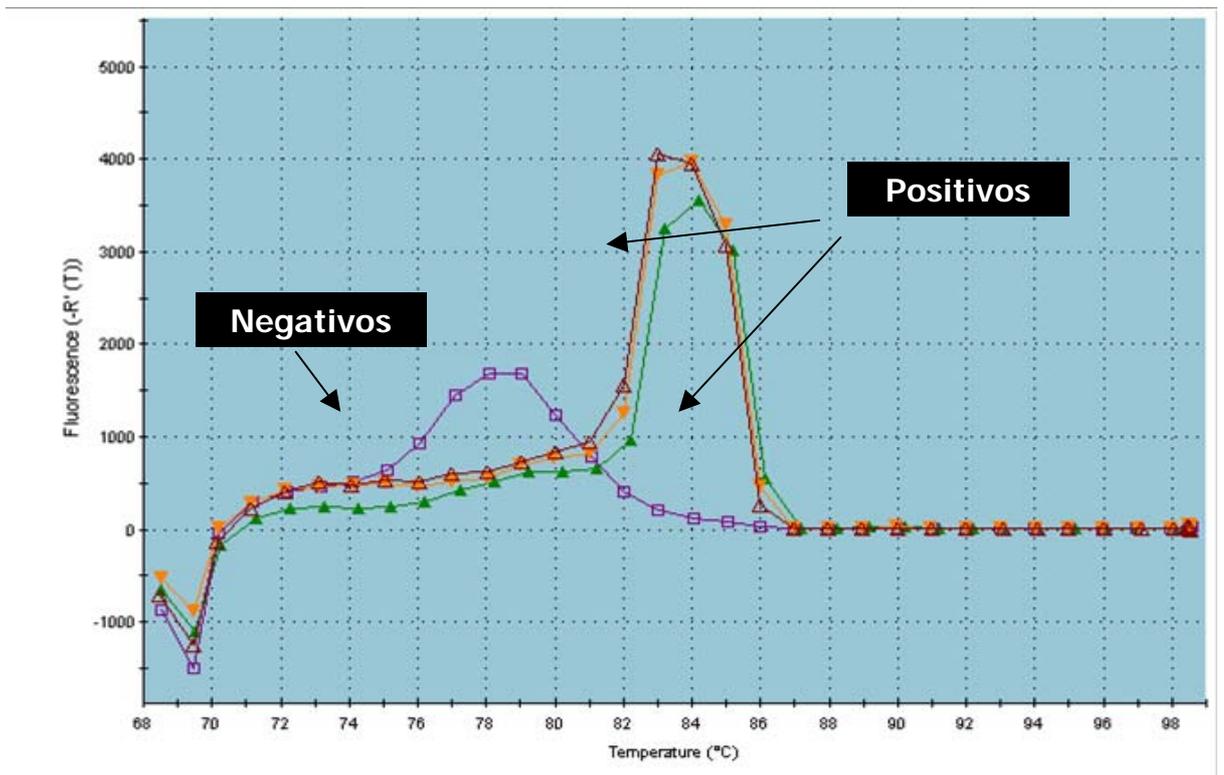


Fig. 2. Curva de disociación en real time RT-PCR con SYBR Green

Una vez secuenciadas las muestras positivas, se encontraron tres variantes genéticas en nuestros aislados con homologías variables: 98% con la cepa Nigbo-43, 94% con la cepa Lelystad y 95% con la cepa Sok-9. Siendo la Nigbo-43 la predominante y por tanto la elegida para inmunizar a la reposición. No se observaron co-infecciones con más de una cepa.

Mediante de extrapolación en la curva estándar del ciclo de la PCR en las que las muestras dieron positivo (conocido como ciclo umbral) las cargas virales de las muestras analizadas se situaron alrededor de 10^5 copias de virus.

Se procedió a la inmunización activa de los animales de reposición (200 hembras) con suero de animales infectados con la variante genética predominante. De esta manera, y ante ausencia de protección cruzada de las vacunas existentes en el mercado, se obtienen madres inmunes a la variante predominante y por lo tanto, menores pérdidas ocasionadas por esta enfermedad en la granja. Los animales presentan una inmunidad homogénea y la población viral circulante es uniforme. En el caso de la granja estudiada, debido al análisis aleatorio de muestras de diversos animales, y no de toda la población, los datos obtenidos hacen referencia a la situación de la granja como unidad. Se observó que las muestras analizadas presentaban una respuesta variable a la inmunización, apareciendo desde animales con viremia hasta animales que no habían sufrido infección.

Discusión

La combinación de métodos de diagnóstico moleculares e inmunológicos nos ha permitido conocer la variante genética del virus predominante en la granja y así, establecer unas medidas de manejo adecuadas que ayuden al control de la enfermedad. En nuestro caso, debido a la existencia de tres cepas diferentes en la granja, nos ha permitido elegir la predominante, Nigbo-43 y uniformizar la infección con solo esa variante.

La RT-PCR en tiempo real presenta una serie de ventajas frente a la convencional: evita posibles contaminaciones en el producto final, evita la electroforesis en gel, es más sensible y permite cuantificar cargas virales.

Una de las características más destacadas es la cuantificación de la carga viral, la importancia de poder cuantificar es que podemos relacionar la carga viral con la patología que presentan los animales, conociendo el grado de infección que presenta cada individuo, llegando incluso a detectar animales portadores. En el caso estudiado, la carga viral se situaba en torno a las 10^5 copias de virus y en casi todos los animales positivos mantenía niveles similares.

Una vez conocemos la carga viral de los animales, también es interesante conocer la cepa circulante predominante para decidir la población viral frente a la que se quiere que los animales tengan anticuerpos neutralizantes. Debido a que las vacunas comerciales actualmente carecen de protección cruzada, el control de este punto es muy importante para evitar futuras pérdidas en la granja a causa de la recirculación de alguna subpoblación.

La variabilidad observada en los resultados de la inmunización puede deberse a diversas causas, tanto de manejo (malas prácticas en la inoculación) como de variabilidad individual (altos títulos de anticuerpos neutralizantes, presencia de condiciones debilitantes, etc....)

Para obtener un buen control de la enfermedad, además de la RT-PCR, la realización de ELISAs frente a anticuerpos es importante para asegurar que la generación de la inmunidad alcanza niveles que garantizan la adecuada protección de los animales.

Agradecimientos

Los autores quieren agradecer el buen trabajo realizado por las técnicas de laboratorio Belén Rivera y Rocío Sánchez.

Bibliografía

Albina E., 1997. Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): an overview, *Vet. Microbiol.*, 55: 309–316.

Andreyev MD, Wesley RD, Mengeling WL, Vorwald AC. and Lager KM. 1997. Genetic variation and phylogenetic relationships of 22 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) field strains based on sequence analysis of open reading frame 5, *Arch. Virol.*, 142: 993–1001.

Zimmerman J, Yoon KJ, Wills RW and Swenson RL. 1997. General overview of PRRSV: a perspective from the United States, *Vet. Microbiol.*, 55:187–196

Oleksiewicz MB, Bøtner A, Madsen KG, Storgaard T. 1998. Sensitive detection and typing of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by RT-PCR amplification of whole viral genes. *Vet Microbiol.*, 64:7-22

Donadeu M, Arias M, Agüero M, Gomez-Tejedor C, Agüero M, Romero LJ, Christianson W, Sanchez-Vizcaino JM. 1999. Using PCR to obtain PRRSV-free piglets from endemically infected herds. *Swine Health Prod.*; 7: 255-261.