

AISLAMIENTO VIRAL Y RESPUESTA SEROLÓGICA EN CERDOS INOCULADOS CON DIFERENTES DOSIS DE UN AISLADO MEXICANO DEL SÍNDROME RESPIRATORIO Y REPRODUCTIVO PORCINO.

Coba AMA^{1*}, Martínez LA¹, Weimersheimer RJ¹, Correa GP¹, Lara PH², Díaz EE², González SD¹, Pérez SJ¹, Castillo N¹, Torres BJ¹.

¹CENID-M, INIFAP, SAGARPA, Carr. Méx. Toluca, km 15.5, Col. Palo Alto, Cuajimalpa, D.F., CP. 05110; ²Boehringer Ingelheim Vetmedica.

Introducción. - El síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS) fue diagnosticado por primera vez en 1987 en los EUA, y en 1990 en Europa, y después se ha detectado en diversos países. El PRRS ha sido considerado como una de las enfermedades económicamente más importante de los 90's; además de que es altamente contagiosa. Estas pérdidas se deben principalmente a problemas respiratorios en lechones y reproductivos en las cerdas. El método primario de transmisión del virus es a través del contacto directo de un animal enfermo con uno sano, por secreción oro-nasal y por movilización de cerdos infectados entre granjas. El período de incubación de la enfermedad es muy variable oscilando entre 1 y 24 días; así, la presentación clínica dependerá de la edad de los cerdos. El virus, clasificado como un RNA de la Familia *Arteriviridae*, género *Arterivirus*, se multiplica en los macrófagos del pulmón, detectándose en el citoplasma a las 6 horas después de la infección, produciendo una viremia, que puede ser detectada desde el primer día postinfección y que puede durar hasta 56 días. El subsecuente desarrollo de lesiones causadas por la infección, dependerá de la cepa del virus, edad del cerdo, infección simultánea con otras bacterias o agentes virales y factores del medio ambiente. El aislamiento del agente causante de la enfermedad, ha posibilitado el desarrollo de técnicas diagnósticas; no obstante, aún existen pocos datos sobre la situación real de la enfermedad en los distintos países, incluyendo a México. El objetivo de este trabajo fue intentar el aislamiento del virus y evaluar la respuesta serológica en cerdos recién destetados, inoculados con tres diferentes dosis, de un aislado de campo mexicano del PRRS, utilizando el método de nebulización para la inoculación, bajo condiciones experimentales.

Material y Métodos. - Para el desarrollo del trabajo se adquirieron 51 cerdos de tres semanas de edad, libres de anticuerpos contra PRRS, pseudorrabia, fiebre porcina clásica, *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Mycoplasma hyopneumoniae*. Se formaron 3 grupos de cerdos: el Grupo Control (de 12 cerdos), y los tres Grupos inoculados (de 13 cerdos cada uno). Cada grupo fue instalado en unidades de aislamiento diferentes y cada grupo fue atendido por personal diferente. Inicialmente los cerdos permanecieron en observación clínica por 4 días. El aislado utilizado fue el denominado BIV00PRRS26M, caracterizado previamente por los laboratorios Boehringer Ingelheim Vetmedica (BIV) S. A. de C. V. Para el desafío se utilizó una cámara de nebulización cerrada, con 3 nebulizadores; la presión utilizada fue de 1.5 a 2.5 kg/cm², y cada grupo inoculado recibió, respectivamente, las siguientes concentraciones virales: 10^{2.0} dosis infectantes para cultivos celulares (DICC)/ml, 10^{3.0} DICC /ml y 10^{4.0}DICC/ml; el virus fue titulado previamente en la línea celular MA 104, con base en el efecto citopático (ECP) y por la prueba de inmunofluorescencia (IF). Posteriormente, cada una de las diluciones fue nuevamente titulada, bajo el mismo procedimiento. La dosis inoculada fue equivalente a 3 ml por cerdo, y de 39 ml por grupo, dando un tiempo de exposición de 40 minutos para cada grupo. Primeramente se trabajó con el Grupo Control, al cual sólo se le administraron 36 ml de células MA 104 lisadas y suspendidas en medio mínimo esencial (MEM); el siguiente Grupo recibió la concentración de 10^{2.0}; el tercer grupo 10^{3.0}; el cuarto grupo, la dosis de 10^{4.0}. Después del desafío cada grupo fue llevado a su unidad de aislamiento. Diariamente todos los grupos de cerdos fueron evaluados clínicamente, y se les registró su temperatura rectal, y periódicamente se tomaron muestras de sangre para obtener el suero. Estas muestras se colectaron antes del desafío (día -1) y los días 2, 4, 6, 13, 20 y 27 post-desafío (PD), y fueron identificadas y almacenadas a -70 C, para realizar posteriormente el aislamiento viral y la detección de anticuerpos por la prueba de ELISA. El sacrificio de los cerdos se realizó el día 27 PD por un método no cruento, y se realizó la necropsia; de todos los cerdos se colectaron muestras de tejidos, así como macrófagos alveolares de los pulmones, utilizando MEM estéril y fueron almacenados a -70 C hasta su estudio.

Resultados y Discusión. – Al titular el inóculo utilizado para el desafío de cada grupo, se encontró que después del desafío, tenía el mismo título inicial de $1 \times 10^{2.0}$ DICC /ml; $1 \times 10^{3.0}$ DICC /ml y de $1 \times 10^{4.0}$ DICC /ml. La respuesta serológica, de todos los grupos, fue evaluada mediante la prueba de ELISA (IDEXX PRRS Herd Check); y el cálculo del valor positivo (S/P) fue realizado siguiendo el procedimiento del laboratorio productor. El Grupo Control siempre fue negativo a la presencia de anticuerpos (Acs). En el Grupo inoculado con $10^{2.0}$ se encontraron Acs a partir de los 13 días PD (DPD), en 6 de 13 cerdos, con un valor S/P máximo de 0.8; y de los 20 y los 27 DPD, con un S/P de 2.6 y 2.8 en los 13 cerdos. En los cerdos inoculados con $10^{3.0}$, hubo Acs a partir del 6º DPD, en 3 de 13 cerdos, con un S/P máximo de 1.0; a los 13 DPD, 12 de los 13 cerdos, tenían un valor máximo de 2.0; a los 20 DPD, en 12 de 13 cerdos, había un S/P máximo de 2.2 y a los 28 DPD en los 13 cerdos, hubo un S/P máximo de 2.2. Con la dosis de $10^{4.0}$ los Acs se detectaron a partir del 6º DPD, en 1 de 13 cerdos, con un S/P máximo de 1.2; a los 13 y 20 DPD en los 13 cerdos, con un S/P de 2.2 y a los 27 DPD en los 13 cerdos, hubo un S/P máximo de 2.4. Respecto al aislamiento del virus del PRRS (VPRRS) a partir de los sueros, se observó ECP del 2º al 13º DPD en los inoculados con $10^{2.0}$, $10^{3.0}$ y $10^{4.0}$ y fueron negativos a partir de los 20 DPD; los macrófagos alveolares fueron negativos. Los sueros del Grupo Control en ninguno de los muestreos mostraron ECP, ni se detectó el virus por IF, por lo que se consideraron negativos. Cuando los sueros del inoculado con $10^{2.0}$ se titularon por IF, se encontró lo siguiente : hubo un título de 10^3 en el 2º DPD; de $10^{3.3}$ en el 4º DPD, de $10^{3.5}$ en el 6º DPD; y de $< 10^{1.5}$ los días 13, 20 y 27 PD; y en los inoculados con $10^{3.0}$, un título de $10^{3.0}$ el 2º DPD, de $10^{3.3}$ el 4º DPD y de $10^{3.5}$ el 6º DPD y $< 10^{1.5}$ los días 13, 20 y 27 PD; en los que recibieron $10^{4.0}$, el título el 3er DPD fue de $10^{3.7}$, de $10^{3.0}$ el 4º DPD, de $10^{3.5}$ el 6º DPD y de $10^{4.0}$ el 13º DPD y $< 10^{1.5}$ los días 20 y 27 PD. De lo anterior se puede concluir que las diluciones del aislado mexicano usadas en el desafío, vía nebulización, no sufrieron modificaciones en su título. Se ha informado que otras vías de desafío, como la intramuscular y la intranasal, dan buenos resultados para infectar a los cerdos. El virus se logró aislar a partir del 2º DPD en las 3 concentraciones usadas. También se observó la presencia de ECP, al 2º día de inoculación de las células y no se encontraron diferencias en cuanto a la detección del virus por IF y la presencia de ECP. Sin embargo, sí hubieron diferencias en el título del virus entre las 3 diluciones inoculadas, ya que la concentración $10^{4.0}$ fue la que mayores títulos causó al 2º DPD ($10^{3.7}$), con un título máximo de $10^{4.0}$ el día 13 PD; al igual que la concentración $10^{3.0}$; y se observó que conforme se aumentó la concentración, mayor fue el título de virus detectado por IF. Los niveles de Acs se detectaron a partir de los 6 DPD con las concentraciones de $10^{3.0}$ y $10^{4.0}$ los cuales se mantuvieron hasta el final del experimento; pero la mejor respuesta se obtuvo con las concentraciones $10^{3.0}$ y $10^{4.0}$. Y en cuanto al mayor número de cerdos en los que se detectaron Acs fue con la concentración $10^{3.0}$. Por lo anterior se puede estimar que dentro de las condiciones de este experimento, la inoculación con 3 ml por cerdo, del aislado BIV00PRRS26M con un título de $10^{4.0}$, fue la que mejor respuesta mostró, en cuanto al nivel de Acs detectados

Conclusiones. – Las dosis mencionadas del virus ($10^{2.0}$, $10^{3.0}$ y $10^{4.0}$), la vía nebulización y el método utilizado, fueron adecuados para lograr infectar a los cerdos, usando 3 ml por cerdo. Dado que se logró aislar el virus a partir de los animales infectados, desde el 2º DPD, y porque se lograron detectar anticuerpos contra el VPRRS, correspondientes al aislado mexicano BIV00PRRS26M.

Implicaciones. – Con el desarrollo de este trabajo se logra establecer más información en México, acerca del comportamiento de una cepa mexicana del VPRRS, bajo condiciones controladas. También se aporta información útil para establecer la posibilidad de usar esta cepa como virus de exposición en posteriores pruebas de potencia de productos biológicos contra esta enfermedad .

Literatura.

- Yoon KJ, JJ. Zimmerman, ChCh Chang, S Cancel-Tirado, KM. Harmon, MJ. McGinley. 1999. Vet. Res. 30, 629-638.
- Benfield D. A., J. E. Collins, S. A. Dee, P. G. Halbur, K. D. Rossow, G. W. Stevenson and J. J. Zimmerman. 1999. Disease of Swine, 8th edition. Iowa State University Press/Ames, Iowa. USA. pp 201-232.