

## ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO SOBRE LA VARIACION GENETICA DEL VIRUS DEL SINDROME REPRODUCTIVO Y RESPIRATORIO DEL CERDO (PRRSV)

\*Batista L<sup>1</sup>, Pijoan C<sup>1</sup>, Morales Santini, LF<sup>2</sup> y Murtaugh MP<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Swine Disease Eradication Center, <sup>3</sup> Veterinary Pathobiology, University of Minnesota, St. Paul, MN, USA, <sup>2</sup>Pecuaria San Luis, Navojoa, SON, MEX

**Introducción y Objetivos.** El síndrome reproductivo y respiratorio del cerdo (PRRS) es actualmente uno de los problemas infecciosos más importantes de la industria porcina mundial. (1, 2). La diferencia en los signos clínicos y la aparente emergencia de nuevos síndromes se deben en parte a los cambios en el genoma del PRRSV (3). La variación biológica ocurre como consecuencia natural de la replicación viral, esta variación es la máquina biológica que permite que el virus se adapte y persista ante los cambios del medio, además nos permite reconstruir los patrones de cambio viral en el campo. La identificación precisa de los aislamientos del PRRSV mediante la determinación de la secuencia de nucleótidos del material genético es una herramienta muy valiosa para identificar la (s) cepas presentes en una piara, para entender el éxito o fracaso de las estrategias de control y/o erradicación (4), posibles fuentes de introducción a piaras libres y de dispersión por área, además de diferenciar entre los virus de campo y vacunales.

Las secuencias, ya sean de nucleótidos o de aminoácidos, de los aislamientos del PRRSV de diferentes granjas raramente son idénticos. La variación ocurre ya sea porque las bases pueden cambiar durante la replicación viral, un proceso llamado mutación, o porque el material genético se recombina y produce nuevos virus por la mezcla de dos virus preexistentes, o por transferencia de genes (5). Los cambios en la secuencia de los nucleótidos pueden dar un cambio en la secuencia de aminoácidos y por lo tanto producir un virus con diferentes propiedades. La nueva forma esta relacionada con la forma ancestral de la que se derivó y a la que es casi idéntica. Las relaciones entre los aislamientos de PRRSV pueden deducirse al comparar las secuencias entre sí. Los cambios son acumulativos, mientras que aislamientos muy relacionados son casi idénticos, los aislamientos distantes tienen las mismas diferencias que los aislamientos tempranos y además cambios adicionales que los hacen únicos. La región que generalmente se secuencía es el marco de lectura conocido como ORF5 (open reading frame) que tiene 600 pares de bases y que codifica una proteína de 200 aminoácidos conocida como la glicoproteína de la cápsula. El ORF 7 que codifica a la proteína de la nucleocápside del PRRSV también se utiliza para análisis genéticos. Tiene 372 bases y codifica a una proteína con 123 aminoácidos, este gen es mucho más conservado que el ORF 5 y en algunos casos puede parecer que los aislamientos son iguales mientras que la secuencia del ORF5 sugiera lo contrario.

**Objetivo.** Los objetivos de este estudio fueron: iniciar una base de datos de la secuencia genómica de diferentes cepas de PRRSV presentes en México y, describir la variación genética de diferentes aislamientos del PRRSV recuperados de granjas de diferentes regiones geográficas que permita entender la dispersión del PRRSV en la República Mexicana.

**Material y Métodos.** Se obtuvieron muestras de suero (n= 33) de hembras del pie de cría (n= 12), lechones del destete (n= 16) y engorda (n=3) sospechoso de encontrarse en proceso de viremia de un total de 13 granjas de Sonora (Noroeste) y 6 granjas de Puebla (Centro-Sur). Se muestrearon 5 animales de cada granja y los sueros se mezclaron (pools) para su análisis. Esta mezcla se hizo con el fin de aumentar la probabilidad de encontrar muestras positivas en las diferentes granjas. Las muestras de suero fueron enviadas al laboratorio de diagnóstico para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Treinta y una de las treinta y tres muestras enviadas resultaron positivas a PCR de PRRSV. Estos aislamientos (n= 31) fueron comparados con base al marco de lectura (ORF) 7. El ORF7 es comúnmente utilizado como blanco del PCR de PRRS y por lo tanto fue seleccionado para este estudio.

**Resultados y Discusión.** Se encontró variación genética entre los diferentes aislamientos. La comparación entre los 31 aislamientos mostró que el porcentaje de homología del ORF7 varió entre el 80 y 100%. La figura 1 muestra el análisis filogenético (dendograma) de la comparación de los diferentes aislamientos de las dos zonas (CS y NW). Sorprendentemente se encontraron

tres grupos que solo contenían un aislamiento cada uno (**30D**, **15dP** y **31D**). Las cepas **15dP** y **31D** eran totalmente diferentes al resto de las otras secuencias indicando que procedían de un ancestro totalmente diferente. Otro hallazgo interesante fue que la variación entre los aislamientos no se correlacionaba, como era de esperarse, con la proximidad geográfica o en algunos casos con el proveedor de semen y/o pie de cría. También se encontró que varios aislamientos de las dos áreas se encontraban muy relacionados a pesar de que las granjas de donde fueron aislados están ubicadas a varios miles de kilómetros de distancia. Esto sugiere una fuente común de infección, situación que debió ocurrir 3 a 5 años previos a la realización de este estudio. Adicionalmente los aislamientos de dos granjas de la misma empresa eran muy similares (**12aP** y **13bP**; **19aP** y **20bP**), lo que sugiere muy poca variación genética a través de los años. Como se puede observar en las secuencias **1P-8D** presentan una homología del 100 y del 99% con **9E**. Sin embargo hay una diferencia de por lo menos 10% entre las cepas **10aP** y la **11aE** a pesar de pertenecer a la misma granja. Al comprar el grupo (cluster) que contiene a las cepas **12aP**, **13bP** y **10aP** observamos una clara fuente de infección entre granjas de diferentes empresas pero ubicadas dentro de la misma región de producción. Otro hallazgo interesante fue que en una de las granjas de donde se secuenciaron aislamientos de las dos granjas de pie de cría (**19aP** y **20bP**) y del destete (**21a-bD**) se encontró que las cepas provenientes del pie de cría son 100% homólogas y también con la cepa vacunal **VR2332**. Este hallazgo es interesante pues tenemos total certeza de que en esta granja nunca se ha utilizado la vacuna. Existen tres posibles explicaciones a este resultado: 1) que la granja se haya infectado con el virus vacunal vía la introducción de pie de cría vacunado y/o semen contaminado con esta cepa ó 2) que haya habido una introducción lateral de esta cepa por algún vector mecánico, biológico o fomites ó 3) que existan cepas de campo que tengan un ORF 7 idéntico al vacunal, pero que varíen genéticamente de la cepa vacunal en los otros ORF's. Por otro lado las dos cepas aisladas del pie de cría de esta granja solo presentaron una homología del 90% con la cepa aislada del destete de esas mismas granjas. También podemos observar que las cepas **22aD**, **23bD** y **24cD** a pesar de ser de la misma empresa y de la misma etapa de producción varían en homología del 4 al 10%. Finalmente en una de las granjas muestreadas (**29D**) se encontró 1 cepa que presentó una inserción de tres bases (CAA), o sea un aminoácido de más. Esta es una situación muy poco común que al inicio nos hizo suponer la presencia de más de una cepa en la muestra. Sin embargo, el análisis posterior de 10 clones de la misma cepa demostraron que era una sola cepa con una inserción extra; hallazgo que hasta la fecha no había sido reportado en el ORF 7 del PRRSV (Murtaugh comunicación personal).

Los análisis genéticos y las diferentes presentaciones clínicas reportados en el mundo sugieren que el virus cambia rápidamente. Nuestros estudios preliminares sugieren que esta variación es mucho más moderada en México, ya que los aislamientos de las 2 regiones estudiadas, así como de algunos dentro de las mismas empresas han permanecido sino similares si con un muy bajo porcentaje de variación. Estos resultados pueden deberse a una menor densidad porcina y movimiento de animales comparado con los Estados Unidos de Norteamérica. Finalmente no debemos olvidar que la interpretación y uso de la información de secuenciación dependen de la disponibilidad de información de buena calidad. Hasta ahora la información de secuenciación no puede utilizarse para hacer inferencias sobre las propiedades biológicas del virus. Por lo tanto los cuestionamientos con relación al impacto de la diversidad genética del PRRSV en la severidad de los signos clínicos y diferentes manifestaciones e inmunidad siguen hasta hoy sin respuesta.

**Implicaciones.** La caracterización de la variación del PRRSV es útil pues nos permite la reconstrucción de los patrones de cambio en el campo. También nos permite determinar si las cepas recuperadas de una granja se originaron de aislamientos preexistentes o representan nuevas introducciones externas. Es útil también para investigar las diferencias y similitudes entre aislamientos en un grupo de granjas con las mismas fuentes potenciales de contaminación (v.g. semen, pie de cría, etc.) y para elaborar hipótesis sobre la dispersión por área y posibles rutas de transmisión en cierta área geográfica. Finalmente es muy útil para afinar el protocolo de aclimatación que utiliza la exposición a la cepa(s) homóloga de la granja (6).

**Agradecimientos.** Al personal del laboratorio IASA de Tehuacán, Puebla, México por su profesionalismo y cooperación en el desarrollo de este proyecto.

#### Referencias

1. Loula TJ. 1991. *Agri Prac*.12:23-34.

2. Dee SA, et al. 1997. Vet Rec 40:498-500.
3. Murtaugh MP, et al. 2002. SHAP 10:15-21.
4. Murtaugh MP, et al. 2001. Proc. AD Leman Swine Conference 28:60-66.
5. Kapur V, et al. 1996 J Gen Virol 77:1271-1276.
6. Batista L, et al. 2002 SHAP (aceptado para publicación)

**Figura 1: Análisis filogenético (filograma) de la comparación de los diferentes aislamientos estudiados**

**Claves**

Números negros: *Zona Centro Sur*  
 Números blancos: *Zona Noroeste*  
 Fondo similar: *misma empresa*  
 a-d= misma empresa, diferente granja  
 P= *pie de cría*  
 D= *destete*  
 E= *engorda*

Mesa Redonda

