

AISLAMIENTO VIRAL Y RT-PCR EN CERDOS SPF, VACUNADOS CON UNA VACUNA VIVA MODIFICADA DEL VPRRS Y DESAFIADOS CON UNA CEPA NACIONAL DEL VPRRS. Parte IV

Coba AMA^{1*}, Martínez LA¹, Weimersheimer RJ¹, Correa GP¹, González SD¹, Lara PJH², Díaz EEF², Pérez SJ¹, Castillo N, Torres BJ³, López HMA; Alvarez GA, Hernández PJ²; Rodríguez HAM², Ortega SR⁴, Hernández LLJ². ¹CENID-M, INIFAP, Carr. Méx. Toluca, km. 15.5, Col. Palo Alto, Cuajimalpa D.F., CP. 05110; ²Boehringer Ingelheim Vetmedica, S.A. de C.V.; ³UAM-Xochimilco, ⁴UMSNH. E-mail: cobaayala@yahoo.com, jlara@gua.boehringer-ingelheim.com

Introducción: El PRRS se caracteriza por falla reproductiva en cerdas y problemas respiratorios principalmente en lechones y cerdos en crecimiento ^{2,4}; y actualmente es considerada como una de las enfermedades económicamente más importantes ²; es causado por un virus clasificado como un RNA de la Familia *Arteriviridae*, género *Arterivirus*, que se multiplica en los macrófagos alveolares, 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 ². Es un virus RNA envuelto de cadena (+), con un diámetro de 50-70 nm. La secuencia genómica del virus ha sido determinada y el RNA tiene 15 Kb de largo y codifica 8 ORFs ⁴, los ORFs 1a y 1b comprenden cerca del 80% del genoma y codifican las proteínas no estructurales, y los ORFs 2 al 7 codifican las proteínas estructurales ¹. A partir de éstas proteínas se han generado una amplia variedad de anticuerpos monoclonales que han sido utilizados para el diagnóstico y la diferenciación de los diferentes aislados (Europeo y Americano) ^{1,4}. El aislamiento del virus, ha posibilitado el desarrollo de técnicas diagnósticas ^{2,3}, por lo que la confirmación del diagnóstico en el laboratorio está principalmente basada en el aislamiento del virus, detección de anticuerpos y la identificación del virus, por la prueba de inmunofluorescencia (IF), o por la de RT-PCR; ésta última ofrece distintas ventajas sobre otras técnicas, por la rapidez de resultados, su sensibilidad y especificidad diagnóstica ^{3,4}. El objetivo del trabajo fue realizar la detección del virus vacunal y de desafío en cerdos SPF, que fueron vacunados con Ingelvac[®] PRRS MLV, y desafiados con una cepa nacional del virus de PRRS (BIV00PRRS26M), utilizando la técnica de aislamiento viral, IF en cultivos celulares y RT-PCR.

Material y Métodos: Se utilizaron 115 lechones de tres semanas de edad, libres de anticuerpos contra PRRS, Aujeszky, fiebre porcina clásica, *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Mycoplasma hyopneumoniae*. Los animales fueron divididos de manera aleatoria en 5 grupos de 18 lechones cada uno; y dependiendo del grupo, se incluyeron 5 lechones centinelas que se incluyeron, 24 horas después de aplicar la vacuna (1ª fase); y 5 centinelas en los grupos correspondientes, a las 48 horas después del desafío (2ª fase). Los tratamientos por grupo fueron los siguientes: **Grupo Control Negativo/no vacunado/no desafiado**; **Grupo Control Positivo/no vacunado/desafiado**, más 5 centinelas (2ª Fase); **Grupo Vacunado/no Desafiado**, más 5 centinelas (1ª y 2ª Fase); **Grupo Vacunado/Desafiado**, más 5 centinelas (1ª y 2ª Fase) y **Grupo que recibió solamente el Diluyente/Desafiado**. Los cerdos fueron identificados e instalados en las Unidades de Aislamiento del CENID-M, ubicados en sitios distantes y atendidos por personal diferente, cumpliendo con las medidas de bioseguridad. El biológico utilizado fue la vacuna Ingelvac[®] PRRS MLV (Lote JA-732A-470), aplicando a cada cerdo 2.0 ml, vía intramuscular (IM) en la tabla del cuello, para los grupos

correspondientes; la cepa de desafío nacional utilizada fue la BIV00PRRS26M, a una dosis de 3 ml/cerdo, con un título de $1 \times 10^{4.0}$ DICC/ml, para lo cual se utilizó una cámara de nebulización, administrándola por un período de 40 minutos. El diluyente utilizado fue el de la vacuna vs PRRS, a dosis de 2.0 ml/IM, en la tabla del cuello. La vacuna y la cepa de desafío, fueron titulados por la prueba de IF antes y después de ser aplicados. La vacuna se administró el día 0 del experimento y los cerdos fueron observados clínicamente por 28 días; y el día 29 los cerdos de los grupos: control positivo, control diluyente, vacunado y desafiado fueron desafiados. Todos los cerdos fueron observados clínicamente durante 49 días; se les registró su temperatura rectal y se colectaron muestras de sangre para obtener el suero. Estas muestras se tomaron los días -7, 0, 2, 4, 7, 14, 21, 28, 31, 36, 43, y 49 del experimento; todas las muestras fueron identificadas y almacenadas a -70°C , para realizar posteriormente el aislamiento viral y la detección de anticuerpos por la prueba de ELISA (IDEXX PRRS Herd Check). El sacrificio de los cerdos centinelas de la 1ª Fase fue el día 28 del experimento; y el día 49 se sacrificaron todos los cerdos del experimento, por un método humanitario y se realizó la necropsia. De todos los cerdos se colectaron muestras de tejidos, así como macrófagos alveolares, utilizando MEM estéril y las muestras colectadas fueron almacenadas a -70°C hasta su estudio. El aislamiento viral se realizó a partir de las muestras de suero, identificando el antígeno-PRRS por la prueba de IF y por RT-PCR ⁵.

Resultados y Discusión.- El título de la dilución utilizada de la cepa de desafío, antes de su aplicación, fue de $1 \times 10^{4.0}$ DICC /ml y después del desafío, fue de $1 \times 10^{2.0}$ DICC/ml; el título obtenido de la vacuna antes de la vacunación fue de $1 \times 10^{5.8}$ DICC_{50%}/ml y posterior a la vacunación fue de $1 \times 10^{5.0}$ DICC_{50%}/ml, determinado por la prueba de IF. De las muestras tomadas durante el experimento, se realizaron los aislamientos virales, y el antígeno viral fue identificado por la prueba de IF y por RT-PCR, realizando la titulación de algunas muestras, encontrándose lo siguiente: Grupo Control Negativo, no vacunado ni expuesto: no se detectó antígeno viral en ninguno de los muestreos (M). Control Positivo, no vacunado/expuesto: antes de la exposición los resultados fueron negativos; y después de la exposición (día 31) se detectaron aislamientos positivos por efecto citopático (ECP) e IF, con títulos de $1 \times 10^{1.0}$ DICC/ml; y el día 36 con títulos de $1 \times 10^{2.0}$ DICC/ml; y el día 43 también fue positivo; y fueron negativos el día 49. Grupo Control/Diluyente/expuesto: fue negativo durante los primeros 31 días y el día 36 y 43, fueron positivos por ECP, IF y RT-PCR. Al día 49 fue negativo. Grupo Vacunado/ no desafiado: Negativo al antígeno viral hasta el día 7, y positivo desde el día 14 al 28; el día 21 se detectaron títulos de $1 \times 10^{2.0}$ DICC/ml; y fue positivo al día 28. Posteriormente los muestreos resultaron negativos. Grupo Vacunado/desafiado: El antígeno viral fue detectado los días 4 y 7 por ECP e IF, y al día 14, fue positivo con un título promedio de $1 \times 10^{2.5}$ DICC/ml; en el día 21 mostró un título de $1 \times 10^{2.0}$ DICC/ml; el día 28 fue positivo y en el día 31, fue negativo al antígeno viral. Sin embargo, después de la exposición, en el día 36 fue positivo nuevamente a la detección del antígeno viral, con título de $1 \times 10^{2.0}$ DICC/ml; y ya para los días 43 y 49 fueron negativos. Los centinelas del Grupo Vacunado/no Desafiado (1ª fase) y los Centinelas del Grupo Vacunado/Desafiado (1ª fase): fueron siempre negativos. Los Centinelas del Grupo Control Positivo/no Vacunados/Desafiados (2ª fase): Durante los primeros 8 muestreos se mantuvo negativo; pero los días 36, 43 y 49, la detección antigénica fue positiva. Centinelas del Grupo Vacunado/no Desafiado (2ª fase): Este grupo se mantuvo negativo a la detección del antígeno viral durante el desarrollo del experimento. Centinelas del Grupo Vacunado/Desafiado (2ª fase): Este grupo se mantuvo negativo durante los primeros 31 días del experimento; y en los días 36 y día 43, se detectó el antígeno viral. Y al día 49, la detección de antígeno viral fue negativa. Se puede considerar que la cepa de desafío nacional utilizada para evaluar la potencia de la vacuna funcionó correctamente, ya que se logró detectar en los cerdos expuestos y en sus respectivos centinelas; lo cual también significó que éste virus sí se diseminó de los desafiados a los centinelas. Con respecto a la cepa vacunal, también fue posible detectarla en los cerdos vacunados, y entre el 4º y 28º días postvacunación, pero no en sus centinelas de contacto; por lo tanto la vacuna produjo un período de viremia, pero no se diseminó. Y después del desafío, en los cerdos centinelas se produjo una clara viremia evidentemente causada por el virus de campo, la cual fue de una duración menor que la viremia vacunal.

Conclusión: De lo anterior se puede concluir que la vacuna no evitó la diseminación del virus de campo, pero sí disminuyó el período de viremia de éste, puesto que a pesar de estar vacunados, los cerdos diseminaron el virus virulento a los centinelas.

Implicaciones: Con el desarrollo de este trabajo se establece en México la metodología para la evaluación de este tipo de vacunas contra el VPRRS, para controlar la fase respiratoria; apoyándose con el uso de las técnicas descritas en la literatura para la detección y la identificación del virus de campo y el antígeno vacunal. Asimismo, se estandarizó el uso de la cepa de campo, como virus de exposición, para ser utilizado en posteriores pruebas de biológicos contra esta enfermedad.

Literatura: ²Benfield et al. 1999. PRRS. Disease of Swine. 8th Edition, Iowa State University Press, 201-232; ¹Janneke JM, 2000. Vet. Res. 31(2000)11-21; ⁵Lara PH, et al. 2002. Análisis por RT PCR, y PCRn y secuenciación de cinco aislamientos mexicanos del virus de PRRS Parte II, Memorias congreso nacional AMVEC 2003 ; ⁴OIE. Manual of standards Diagnostic Test and Vaccines 2000. Part3, Section X, Chapter X.12; ³Wagstrom EA, et al., 2000. J. Vet. Diagn. invest. 12:75-78