

NUEVOS MANEJOS Y TECNICA DE DIAGNÓSTICO EN PRRS

J Zimmerman¹, J Prickett¹, J Johnson¹, R Molina²¹College of Veterinary Medicine, Iowa State University, Ames, Iowa²Departamento de Ciencias Agronómicas y Veterinarias, Instituto Tecnológico de Sonora, Cd. Obregón, Sonora, México

INTRODUCCION

Fluidos orales son los líquidos presente en la cavidad bucal, una combinación de la saliva y del “trasudado de la mucosa oral”. La saliva es producida por las glándulas salivales; el trasudado corresponde a líquido proveniente de los capilares submucosos. Los fluidos orales contienen patógenos y los anticuerpos derivados del suero más éstos producidos en los tejidos linfoides asociados a la cavidad bucal. En seres humanos, las muestras de fluidos orales son ampliamente utilizados para la detección de una variedad de agentes infecciosos, de hormonas, de toxinas, y de drogas (Streckfus y Bigler, 2002; Tabak, 2001,2007). Cuando es utilizada en la vigilancia epidemiológica de enfermedades infecciosas, las pruebas basadas en fluidos orales facilitan la colección de una gran cantidad de muestras para diagnóstico a bajo costo: el Departamento de salud e higiene mental de la ciudad de New York (New York City Department of Health and Mental Hygiene) realizó 166.058 pruebas orales para detección de anticuerpos contra VIH del líquido entre del marzo de 2005 al mayo de 2008 en 10 clínicas ambulatorias (Rothman y Kalish, 2009) y en el Reino Unido, las muestras de fluidos orales fueron utilizadas a partir de 11.698 niños en el país y enviadas al laboratorio para detección de anticuerpos (Bartington y otros., 2009)

INVESTIGACIONES BASADAS EN FLUIDOS ORALES EN CERDOS

La detección de PRRSV en líquidos orales de los cerdos experimentalmente inoculados (proyecto financiado por National Pork Board). El propósito de este estudio era (1) se determina si PRRSV o los anticuerpos anti-PRRSV podrían ser detectados en fluidos orales y (2) para determinar la duración y/o el nivel de PRRSV o los anticuerpos anti-PRRSV en fluidos orales. *Diseño experimental:* Tres grupos de cerdos fueron evaluados (4, 8, y 12 semanas de edad). Las muestras de fluidos orales fueron colectadas a intervalos regulares hasta 63 días post inoculación (DPI). Muestras de suero fueron también recogidas de cada cerdo en los mismos intervalos. Después del período de la observación, las muestras fueron seleccionadas al azar y probadas para la presencia de PRRSV por PCR cuantitativo (qRT-PCR) y para la presencia de los anticuerpos del anti-PRRSV por ELISA y por IFA. *Resultados:* El análisis de los datos no demostró (1) diferencia significativa en respuestas del virus o niveles de anticuerpos entre las diferentes edades; (2) Los niveles de los títulos de PRRSV en las muestras de fluidos orales correlacionaron con los niveles encontrados en el suero; (3) >75% de las muestras de fluidos orales por corral inoculados con PRRSV fueron positivo por PCR hasta el día 28; (4) El anticuerpo específico de anti-PRRSV fue detectado usando una ELISA comercial para PRRSV, pero con los valores de S/P bajos. *Conclusiones:* PRRSV fue detectado fácilmente en fluidos orales usando PCR. Los anticuerpos contra PRRSV estaba presentes, pero la ELISA comercial no estuvo suficientemente optimizada para detectar confiablemente los niveles bajos del anticuerpo presentes en fluidos orales. Para información adicional vea a Prickett y otros. (2008a).

Detección PRRSV y PCV2 en las muestras de fluidos orales en campo (proyecto financiado por National Pork Board). El propósito de este estudio fue validar el uso de fluidos orales en estudios de vigilancia epidemiológica en granjas porcinas. *Diseño experimental:* El estudio fue conducido en 3 sitios de finalización. Corrales de aproximadamente 25 cerdos cada uno fueron muestreadas en varias ocasiones en un cierto plazo usando muestras de fluidos orales y del suero para la infección de PRRSV. Las muestras fueron recogidas 5 veces sobre un periodo de 13 semanas. Las muestras fueron seleccionadas al azar y probadas para la presencia de PRRSV por el qRT-PCR y para la presencia de los anticuerpos específicos anti-PRRSV por IFA. Además, las muestras fueron probadas por PCR para circovirus porcino 2 (PCV2). *Resultados:* (1) Como fue visto bajo condiciones experimentales, los títulos PRRSV (qRT-PCR) en suero y líquidos orales fueron correlacionados positivamente; (2) Los resultados cualitativos demostraron buena concordancia entre el suero y el líquido oral con respecto al estado de la infección de los corrales; (3) anticuerpos específicos contra PRRSV fueron detectados en muestras de fluidos orales; (4) Las muestras de fluidos orales también demostraron la presencia del virus PCV2 (qRT-PCR). *Conclusiones:* Las muestras de campo de fluidos orales de cerdos infectados por corrales (destete, crianza y finalización) presentaron niveles perceptibles de PRRSV por PCR por aproximadamente 4 semanas, sugiriendo que las muestras deben ser recogidas cada 2 a 4 semanas en un programa activo de la vigilancia. El PCR específico para PCV2 en muestras del campo también demostró la presencia de PCV2. Los resultados sugirieron que las muestras de fluidos orales basadas en corrales se podrían utilizar para monitorear poblaciones para PRRSV, PCV2, y quizás otros patógeno. Para la información adicional vea a Prickett y otros. (2008b)

Muestreo basado en fluidos orales en granjas de destete-finalización (proyecto financiado Murphy-Brown LLC, Pfizer Animal Health, and the National Pork Board). El propósito de este estudio fue (1) determinar si el personal en sitio podría recoger muestras de fluidos orales y (2) monitorear la circulación de PRRSV, de PCV2, SIV, Torque teno virus y de un nuevo pestivirus porcino (Pogranichniy y otros., 2008) en hatos comerciales. *Diseño experimental:* En cada uno



de 10 sitios a través del medio oeste de Estados Unidos, las muestras de fluidos orales fueron recogidas a partir de 6 corrales por casetas en intervalos bi-semanales desde el arribo hasta sacrificio por el personal del sitio. *Resultados:* Personal de granja colectó y envió muestras de fluidos orales de buena calidad al ISU VDL como estaba programado. Las muestras de fluidos orales fueron probadas por PCR para PRRSV, PCV2, y SIV. Las pruebas para el Teno virus y el pestivirus está en marcha. *Conclusiones:* Aunque la prueba y los análisis están en marcha, los resultados hasta la fecha demuestran que el personal de granja en un sistema comercial grande puede recoger, procesar, y enviar con éxito muestras de fluidos orales de buena calidad. En general, los resultados de PCR demostraron que la circulación de los patógeno (PRRSV, PCV2, gripe) en poblaciones de cerdos puede hacerse usando en muestras de fluidos orales. Para información adicional vea a Hoffman y otros. (2008)

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Las investigaciones publicadas sobre estudios basados en fluidos orales en poblaciones de cerdos se han centrado en la detección de PRRSV, de PCV2, y de SIV mediante análisis de PCR. Las investigaciones en progreso extenderán estos estudios a otros agentes, e.g., Teno virus, pestivirus (Pogranichniy y otros., 2008), y otros. Investigación prometedora (inédita) sugiere que nuevos y/o mejorados análisis de diagnóstico para la detección de anticuerpos contra patógeno específicos, e.g., PRRSV, PCV2, estén disponibles dentro del año próximo.

Particularmente, a medida que análisis anticuerpo-basados lleguen a estar disponibles, los estudios de vigilancia epidemiológica basadas en fluidos orales proveerá métodos para el monitoreo de poblaciones porcinas a costos-efectivos que permitan el desarrollo de programas de control/erradicación, monitoreos de hatos negativos, monitoreo de evaluación vacunas; métodos de control basados en exposición controlada o vacunación y la realización de estudios epidemiológicos.

REFERENCIAS

- Bartington SE, Peckham C, Brown D, Joshi, H, Dezateux C. 2009. Feasibility of collecting oral fluid samples in the home setting to determine seroprevalence of infections in a large-scale cohort of preschool-aged children. *Epidemiol Infect* 137:211-218.
- Hoffman P, Prickett J, Zimmerman J, Karriker L, Main R. March 8-11, 2008. Implementation and validation of swine oral fluid collection in a commercial system. 38th Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinarians. San Diego, California, pp. 301-302.
- Pogranichniy R, Schwartz K, Yoon K. 2008. Isolation of a novel viral agent associated with porcine reproductive and neurological syndrome and reproduction of the disease. *Vet Microbiol* 131:35-46.
- Prickett J, Simer R, Christopher-Hennings, J, Yoon K-J, Evans RB, Zimmerman JJ. 2008a. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in porcine oral fluid samples: a longitudinal study under experimental conditions. *J Vet Diagn Invest* 20:156-163.
- Prickett J, Simer R, Yoon K-J, Kim W-I, Zimmerman J. 2008b. 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.
- Rothman RE, Kalish B. 2009. Update on emerging infections: news from the Centers for Disease Control and Prevention. False-positive oral fluid rapid HIV tests--New York City, 2005-2008. *Ann Emerg Med* 53:151-156
- Streckfus CF, Bigler LR. 2002. Saliva as a diagnostic fluid. *Oral Dis* 8:69-76.
- Tabak LA. 2001. A revolution in biomedical assessment: the development of salivary diagnostics. *J Dent Educ* 65:1335-1339.
- Tabak LA. 2007. Point-of-care diagnostics enter the mouth. *Ann N Y Acad Sci* 1098:7-14.

ANEXO: GUIA PARA MUESTRAS DE FLUIDOS ORALES

Como coleccionar fluidos orales

- Suspender una cuerda del algodón en una localización fácilmente accesible a los cerdos. Use cuerda de algodón - es más absorbente que la cuerda hecha de fibra sintética. Utilice cuerda de 1/2" para cerdos en destete y cuerda de 5/8", después de eso. Los soportes con un 1" agujero para colgar la cuerda son fáciles de fabricar. Pase la cuerda a través del agujero, después anude la cuerda para asegurarla en lugar para la colección.
- Coloque la cuerda en un área limpia del corral, lejos del agua y del alimento a la altura del hombro del cerdo (cuelgue la cuerda, después corte a la longitud). Los de los cerdos depositarán los fluidos orales al masticar la cuerda. En la mayoría de los casos, 10 a 20 minutos son suficiente tiempo del muestreo.
- Extraiga los líquidos de la cuerda insertando la parte húmeda en una bolsa de plástico limpia o una bota de plástico desechable. Exprima la cuerda e incline el bolso de modo que el líquido acumule en una esquina. Corte una esquina del plástico y drene el contenido en un tubo (¡no envíe las cuerdas al laboratorio de diagnóstico!). Si la muestra está limpia, no se requiere procesamiento extra. Si las muestras contienen partículas, centrifugue por 10 minutos y después vierta en un tubo limpio.



Almacenaje y manejo de fluidos orales

- Mantener la cadena fría para preservar integridad de la muestra. Congele las muestras para optimizar la calidad. Las muestras de fluidos orales para la envío el “mismo día” se pueden enfriar y enviarse en el hielo.
- La preparación de estas muestras para envío a laboratorio es similar al realizado para muestras de suero, es decir, enviar en hielo con material absorbente (para capturar derramamientos) en un envase de transporte aislado

Interpretacion de resultados

- Las muestras reflejan la positividad o negatividad del corral.
- Las muestras de fluidos orales positivas por PCR reflejan la excreción / circulación activa de patógeno en la población. Al igual con PRRSV PCRs basados en suero, los resultados negativos para los fluidos orales no significan que los cerdos no están persistentemente infectados con PRRSV ni no han tenido contacto con el virus.
- Pruebas para detección de anticuerpos en fluidos orales para PRRSV o PCV2 están disponibles en algunos laboratorios de diagnóstico, e.g., Laboratorio de Diagnóstico Veterinario de la Universidad Estatal de Iowa.

Recomendaciones para muestreo y analisis.

- NO hacer “pooles” de fluidos orales.
- La cuerda de algodón es generalmente inasequible en los almacenes locales, pero se puede comprar a través del Internet. Otros materiales, especialmente materiales sintéticos, no tienen la absorbencia del algodón.
- Los cerdos del son de vez en cuando renuentes masticar la cuerda en la primera colección. Los cerdos “renuentes” pueden ser entrenados lanzando una cuerda en el corral para que jueguen (quite después de 20 minutos) o mediante e entrenamiento con cuerdas condimentadas con azúcar. Una vez acostumbrados a la cuerda, los cerdos buscan su siguiente oportunidad para jugar.
- Realizar la colección en las mañanas, cuando los cerdos están mas activos. Evite las colecciones por la tarde.
- Las muestras sucias son indicativo de una cuerda a demasiado larga o colgada en la localización incorrecta.
- Los cerdos son atraídos a la cuerda porque es algo nuevo. Quite todas las cuerdas después de cada muestreo para mantener su interés en las colecciones futura. Nunca reutilice la cuerda.