

MEDICION DE PREVALENCIA DEL VIRUS DEL PRRS A TRAVES DE FLUIDOS ORALES EN DESTETE

Alcántar,P^{1*}; Chevez,JC¹; Uribe,A¹; Pinal,F¹; Díaz,E²; Gómez,G³; Cabral,R¹

¹Boehringer Ingelheim Vetmedica, Guadalajara, Jalisco, México; ²Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc. St. Joseph, MO;

³Fabricas de Alimentos González

patzimba.alcantar@boehringer-ingelheim.com

Introducción.

Recientemente, un procedimiento basado en la recolección de fluidos orales para la detección del virus de PRRS y su respuesta de anticuerpos fue desarrollada en los laboratorios de la Universidad Estatal de Iowa^{1,3}

Esta novedosa técnica ideada por el Dr. Jeffrey J. Zimmerman ha podido ampliar y cambiar la visión en cuanto a la recolección de muestras para el diagnóstico y monitoreo de enfermedades virales y bacterianas en el cerdo, y su seguimiento epidemiológico en porcinos. En la investigación y en condiciones de campo, con los fluidos orales colectados de corrales de cerdos infectados con PRRSv se demostró que contienen niveles PCR-detectables. Estos resultados sugieren que muestra de fluido oral puede ser usada para monitorear la circulación de PRRSv en cerdos. El objetivo del estudio fue pronosticar la prevalencia de animales virémicos así como validar la técnica de fluidos orales a través de qPCR (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real).

Materiales y Métodos

El proyecto se llevó a cabo en un Sitio II, en animales de 5, 7 y 9 semanas de edad, mediante la siguiente técnica:

1. Se colgó un trozo de cuerda de algodón de ½" en un el centro de corral (aproximadamente 20 animales por corral).
2. La cuerda se dejó por 20 a 30 minutos, los cerdos en general, mostraron curiosidad y bastante interés a la cuerda, depositando los fluidos orales durante el proceso
3. Se pasó a la extracción de los fluidos orales bajo la siguiente técnica:

Se sostuvo la cuerda mojada dentro de la bolsa, se apretó y/o exprimió la cuerda para que los líquidos se acumularan en la esquina de la bolsa

Posteriormente, se cortó la esquina de la bolsa y vertió el contenido en un tubo de plástico con tapadera.

Tres mililitros de la muestra son adecuados para la prueba de qPCR (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real).

Adicionalmente, se recolectaron muestras de sangre de animales que conformaban los corrales donde fueron colocadas las cuerdas (5 animales por corral = 1 pool por corral).

El RNA viral de las muestras de fluido oral fue obtenido a través del kit comercial MagMAX™ -96 Viral RNA Isolation Kit, así mismo, el RNA viral de las muestras de suero fue obtenido a través del kit comercial QiaampRNA (QIAGEN), una vez realizadas ambas extracciones, fueron almacenadas a -20°C hasta su procesamiento. La técnica de PCR tiempo real se realizó utilizando un Kit comercial Applied Biosystems siguiendo las indicaciones del fabricante, en un equipo Smart Cyler (Cepheid)

Resultados

Al realizar la técnica de qPCR (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real) para ambos tipos de muestras, se obtuvo un 100% de prevalencia tanto por la técnica de fluidos orales, como en suero (Tabla 1). Los resultados fueron analizados usando la técnica estadística **2-Sample t** (Minitab 16), donde, ambas técnicas demostraron que no hay diferencia estadísticamente significativa ($P > 0.05^*$).

Tabla1. Resultados qPCR PRRS

ID	CORRAL	FLUIDO ORAL		SUERO	
		Resultado	Carga viral/ml.	Resultado	Carga viral/ml.
5 SEM	1	POS	1.10×10 ⁶	POS	7.60×10 ⁵
	2	POS	6.10×10 ⁵	POS	1.30×10 ⁷
	3	POS	8.10×10 ⁵	POS	1.40×10 ⁷
	4	POS	8.70×10 ⁵	POS	8.90×10 ⁵
	5	POS	6.00×10 ⁵	POS	1.50×10 ⁷
	6	POS	3.20×10 ⁵	POS	6.10×10 ⁵
7 SEM	1	POS	2.70×10 ⁵	POS	5.60×10 ⁶
	2	POS	4.20×10 ⁵	POS	1.50×10 ⁷
	3	POS	9.00×10 ⁵	POS	3.00×10 ⁶
	4	POS	1.30×10 ⁶	POS	7.20×10 ⁵
	5	POS	2.00×10 ⁶	POS	2.00×10 ⁷
	6	POS	1.50×10 ⁶	POS	5.80×10 ⁶
9 SEM	1	POS	7.60×10 ⁵	POS	1.20×10 ⁶
	2	POS	5.50×10 ⁵	POS	4.20×10 ⁶
	3	POS	6.20×10 ⁵	POS	1.00×10 ⁷
	4	POS	4.40×10 ⁵	POS	1.30×10 ⁷
	5	POS	6.30×10 ⁵	POS	1.50×10 ⁶
	6	POS	7.30×10 ⁵	POS	2.80×10 ⁶

*P=0.163 (5 semanas de edad), P=0.064 (7 semanas de edad), P=0.061 (9 semanas de edad)

Conclusión y Discusión

En base a el protocolo utilizado, la técnica de fluidos orales demostró ser un método efectivo para el monitoreo de animales viremicos al virus del PRRS. Al usar esta técnica se disminuye de manera importante el manejo y estrés de los animales durante la recolección de muestras a diferencia de la toma convencional de suero. Adicionalmente encontramos una reducción en los costos de la prueba del 34%. (Esto puede variar dependiendo de los precios establecidos por los laboratorios). Lo más importante es que no se encontró diferencia estadística significativa, por lo que podemos confiar en la técnica de fluidos orales para medir prevalencias

Referencias

1. John Prickett, R. S.-H.-J. (2008). 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.
2. P Hoffmann, J. P.-J. (s.f.). Infectious disease surveillance in wean-finish facilities using oral fluid sampling. Disease Ecology Laboratory, College of Veterinary Medicine, Iowa State University.
3. Prickett, J. R., Simer, R., Yoon, K.-J., & Zimmerman, J. (2008). Oral-fluid samples for surveillance of commercial growing pigs for porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 infections. *Journal of Swine Health and Production*.