

Actualización sobre el virus de PRRS: Aproximación diagnóstica y alternativas para su monitoreo

Fuente: <https://infopork.com/2020/01/actualizacion-sobre-el-virus-de-prrs-aproximacion-diagnostica-y-alternativas-para-su-monitoreo/>

Autor: Pablo Piñeyro – Department of Veterinary Diagnostic and Production Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Iowa State University, Ames, Iowa, USA

El virus del síndrome reproductivo y respiratorio Porcino (PRRSV) afecta a la gran mayoría de los países productores de cerdos con un gran impacto económico.

Características generales del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino El virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) es y ha sido el causal de las mayores pérdidas económicas en la industria porcina alrededor del mundo. El virus de PRRS emergió en los Estados Unidos a finales de la década del 80, simultáneamente presentaciones clínicas similares se reportaron en Alemania y otros países de Europa. Sorprendentemente se observó que a pesar de la variabilidad genética observada entre las cepas descritas en Europa y en Estados Unidos estos dos virus tenían manifestaciones clínicas similares.

Estos primeros estudios demostraron que la cepa Europea y Americanas sólo compartían entre 50 -70% de homología en su estructura genética. Así, se definieron dos genogrupos distintos; genotipo 1 para las cepas Europeas y genotipo 2 para las cepas Americanas.

El virus de PRRSV es un virus ARN dentro de la familia Arterivirus y orden y Nidovirales. El virus presenta proteínas estructurales (N, nucleocapside; M, membrana, E, envoltura; glicoproteínas GP2-GP5) y 14 proteínas no estructurales (nsps). La manifestación clínica puede variar desde formas leves asintomáticas, a enfermedad severa asociada con altos índices de mortalidad debido a infecciones secundarias, susceptibilidad del hospedador, inmunidad de la piara, y virulencia de la cepa actuante. Los animales adultos cuando son afectados presentan anorexia y fiebre seguido de fallos reproductivos (aborto, incrementó en el número de momias y retorno al estro). Los animales recién destetados pueden sufrir cuadros respiratorios severos, los cuales se ven agravados muchas veces por co-infecciones virales con el virus de influenza o circovirus, así como infecciones bacterianas secundarias. Esto se ve representado en un incremento en la tasa de mortalidad en la etapa de recría, retraso en el crecimiento en animales que se sobreponen a la infección con un retardo en el peso a faena. Una de las característica más importantes y por la cual se hace tan difícil el control y erradicación del virus de PRRS es su capacidad de rápida mutación y evolución. Por ejemplo, en los últimos años se ha descrito en China una nueva variante de alta virulencia la cual es capaz

de causar 100% mortalidad en todos los animales. Así, esta nueva variable descrita en China ya hoy se encuentra ya diseminada en varios países de Asia y Europa.

Otra característica importante del virus de PRRSV es su gran capacidad de diseminación.

Dentro de las vías de diseminación los cerdos pueden ser infectados por contacto directo o contacto indirecto a través de fómites. La exposición al virus de ocurre a través de las vías respiratorias y por infección oronasal a través de las mucosa, e inclusive a través de infección percutánea. La diseminación aerógena se observa a corta y larga distancia. La infección puede ocurrir a través de la ingestión del virus, en forma iatrogénica, y en forma reproductiva a través del coito o inseminación artificial. Generalmente la transmisión vertical es importante en el último trimestre de la gestación. Muchos estudios han demostrado que además de la vía de infección, la dosis infectiva mínima también tiene un papel determinante en para que los cerdos presentan enfermedad clínica. Estudios experimentales parecen soportar la idea que la infección percutánea es la que necesita una dosis infectiva mínima más baja. Por lo tanto todas las maniobras en granja que puedan predisponer a la transmisión subcutánea como cortado de cola, dientes, identificación por marcados de orejas, así como la administración de inyecciones de vacunas o tratamiento medicamentosos pueden tener un factor fundamental en la transmisión del virus en la granja.

Hoy en día el manejo de la enfermedad está basado en la utilización de vacunas, e implementación de medidas de bioseguridad para prevenir la diseminación o introducción del virus a la granja. Numerosas vacunas comerciales se encuentra disponibles incluyendo: a virus vivo modificado, a virus muerto, y vacuna de subunidad proteica. Los programas de aclimatación de los planteles reproductores basado en exposición intencional a la cepa circulante la granja es una de la rutinas que se puede utilizar para inducir inmunidad de rodea en el hato reproductor.

Aproximación diagnóstica al virus de PRRS

Detección directa

El diagnóstico en granja del virus de PRRSV puede tener distintos objetivos los cuales van a tener un impacto directo en decisiones de manejo para animales individuales, generalmente aquellos que ya presentan el problema clínico, así como para el manejo completo de la piara. Así debemos definir los objetivos de los programas diagnósticos, por ejemplo: se pretende determinar infección, determinar la prevalencia en la población de estudio, confirmar exposición, confirmar eliminación/circulación viral, o confirmar la eficacia de planes de vacunación.

Debemos considerar la población de estudio y el momento de evaluación en la granja. El momento en que se lleva a cabo el diagnóstico de granja juega un papel crítico dependiendo del objetivo: determinación de viremia, eliminación viral, determinación de lesiones, respuesta humoral. De esta manera podemos evaluar animales en maternidad, animales recién destetados, animales que llegan al momento de la recría proveniente de distintos sitios o

múltiples granjas, por último animales clínicamente afectados. En cada uno de estos grupos debemos tener en claro si las muestras que estamos utilizando nos va a dar la información necesaria para hacer el diagnóstico individual o el diagnóstico a nivel de granja.

Como la mayoría de las enfermedades virales podemos hacer el diagnóstico directo dónde vamos a determinar la presencia del virus y exposición al mismo en la pira o animales individuales. Dentro del diagnóstico indirecto obviamente trataremos de determinar la presencia de anticuerpos generados por el contacto con el virus.

Para el diagnóstico directo el método más utilizado hoy en día, es la determinación de ácido nucleico por PCR. Distinto laboratorios utilizan distintas regiones del virus como targets para sus diagnósticos, los cuales incluyen cebadores específicos para la proteína estructurales de matriz (ORF 6) o para la nucleoproteína (ORF 7), y para alguna de las proteínas no estructurales (nsp2) Debido a la gran variabilidad genética observada en la región ORF5, las PCR dirigidas contra proteínas estructurales es una de las regiones de preferencia para secuenciación y así evaluar variabilidad genética dentro de la granja dentro del predio o a nivel regional.

Las muestras requeridas para el diagnóstico directo por PCR pueden incluir secciones de pulmón que presenten lesiones características, tonsila, linfonodos, timo, lavado bronco alveolar, semen, sangre, y suero. En casos reproductivos el uso de tejidos obtenidos a partir de fetos abortados sigue siendo una de las muestras más importantes para la determinación del virus como causal de abortos o fallos reproductivos. Cabe recordar, que el virus también puede causar un gran incremento en el número de momias lo cual debe ser diferenciado de otros virus reproductivos como parvovirus. Hoy en día los fluidos orales se utilizan con mayor frecuencia para relevamiento epidemiológico y monitoreo en las granjas, debido a su practicidad y bajo costo.

Otro de los avances que se ha hecho para detección del virus de PRRSV es la evaluación de fluidos de procesado de camada lo cual incluye testículos, y fluidos extraídos de los testículos y colas al momento del procesado de los animales en maternidad. Estas últimas muestras nos permiten evaluar la presencia del virus en granjas de madres, así como así también evaluar si los animales son infectados a temprana edad.

A pesar de las numerosas ventajas de la técnica de PCR, como su rapidez y sensibilidad y especificidad también debemos considerar algunas de sus desventajas. Su alta sensibilidad hace relativamente fácil la posibilidad de contaminación ambiental en granjas endémicas donde el virus está presente en el medio ambiente, otra limitante es la repetitividad entre laboratorios diagnósticos también la cual ha sido altamente cuestionada, y por último su incapacidad de determinar la capacidad infectante del virus al momento de la detección. Uno de los métodos más utilizados para abaratar costo es el agrupamiento de muestras ya sea de sueros, fluidos orales, semen y/o tejidos. La desventaja de esta práctica, es tal vez es la pérdida de sensibilidad al momento de la detección viral especialmente en granjas con baja prevalencia o muestras con baja carga viral.

La mayoría de las PCR ya sean comerciales o desarrolladas en los laboratorios diagnósticos, tienen la capacidad de diferenciar los genogrupos tipo 1 y 2, así mismo como la nueva variante de alta patogenicidad recientemente descrita en China. Uno de los problemas que encontramos hoy en día los Estados Unidos es la incapacidad de la técnica de PCR de diferenciar infección natural o virus vacúnales en aquellos animales que han sido expuestos a vacunas vivas modificadas.

Debemos recordar que la interpretación de los resultados se debe hacer en concordancia con la signología clínica presente en la granja: así, animales positivos por PCR pueden determinar que los cerdos son virémicos (infección natural – vacunación con virus vivo modificado), virus inactivado, o contaminación de la muestra desde el medio ambiente (falso positivo).

Otro de los métodos utilizados para el diagnóstico de PRRSV es el aislamiento viral. El aislamiento viral está basado en la capacidad del virus en producir efecto citopático en un gran número de líneas celulares, incluyendo: MARC-145, BHK21, y CL-262. Células adaptadas que produzcan expresión de reporte CD163 como las células PK15 han sido utilizadas para el diagnóstico y el aislamiento viral. Macrófagos alveolares pueden ser utilizados, la desventaja es como toda célula primaria es que necesitan ser aislados para cada ensayo y no se pueden inmortalizar. Dependiendo de la cepa viral y su virulencia, el efecto citopático a veces puede no ser tan marcado, por lo tanto la confirmación de la infección se debe realizar por marcación con anticuerpos fluorescentes o detección de partículas virales por microscopía electrónica. Tal vez una de las desventajas de este método es el tiempo necesario para la confirmación la cual puede variar entre 5 a 8 días. La interpretación de estos resultados debe ser cuidadosa ya que resultados de aislamiento viral negativo puede significar no sólo que los animales no hayan sido infectados, pero sino también que las partículas presentes no sean infectivas, debido a su bloque por anticuerpos neutralizantes, degradación del virus en las muestras, o baja sensibilidad de las células utilizadas para el aislamiento. Se ha demostrado también que el crecimiento viral desde tejido de abortos tiene aproximadamente la mitad de la sensibilidad que la técnica de PCR para la detección del virus debido a la interferencia por la autólisis de los tejidos.

Como parte de la detección directa también se utiliza con mucha frecuencia la detección directa del virus asociado con la presencia de lesiones. Así evaluación de tejidos fijados para histopatología se puede complementar con detección de antígenos por inmunohistoquímica (IHQ) o ácido nucleico por hibridación in situ (HIS). Para la detección antígeno por IHQ obviamente usamos tejidos fijados en formol al 10% incluyendo: pulmón, tonsila, linfonodos, corazón, cerebro, y bazo. La IHQ tiene gran especificidad y moderada sensibilidad. Recordemos que por sus características las lesiones asociadas a PRRSV pueden ser de carácter multifocal, por lo tanto se deben tomar muestra representativa de pulmón, las cuales deberían incluir al menos 5 secciones por animal evaluado. Este método de muestreo nos permitirá detectar con al menos un 90% de certeza animales infectados con PRRSV. Debemos recordar el tiempo de procesamiento de las muestras es de suma importancia, ya que hay una rápida degradación del antígeno de superficie o del ácido nucleico, lo cual disminuye la sensibilidad de estas técnicas cuando demoramos más de 48 horas para su procesamiento. Como alternativa a la IHQ se puede utilizar inmunofluorescencia de tejidos congelados, esta técnica tiene la ventaja de ser

más rápida y más económica que la IHQ. Para el diagnóstico de tejidos debemos tener en cuenta el momento de infección. El antígeno viral puede ser detectado fácilmente dentro de las primeras 4 semanas post infección. Su detección se vuelve más limitada dentro de los 30-70 días, e indetectable más allá de los 90 días post infección. Dentro de la interpretación de los resultados debemos tener en cuenta qué resultados negativos puede ser no sólo debido a la ausencia del virus de PRRS pero también a errores de muestreo, fallas de la técnica o del operador leyendo la tinción en tejidos, así como variabilidad genética en la cepa evaluada que no sea detectada por los anticuerpos de rutina.

Algunas técnicas que cayeron en desuso pero que podrían ser viables para la confirmación del virus de PRRS son la microscopía electrónica como confirmatoria muchas veces del aislamiento viral. Los bioensayos en los cuales básicamente se replican los postulados de Koch infectando animales con material sospechoso de infección y reproducción de cuadro clínico. Una técnica que se utilizó como diagnóstico rápido en granja pero que hoy está cayendo en desusos son las tiras inmunoreactivas. Talvez el limitado repertorio genético de las tiras, impide la detección en áreas donde hay co-circulación de muchas variables de PRRSV, teniendo así un gran riesgo de resultados falsos negativos.

Detección Indirecta

Uno de los factores más importantes para evaluar los resultados de las pruebas serológicas es conocer la dinámica de los anticuerpos durante la infección por el virus de PRRS. Así, la presencia de anticuerpos calostrales se observa dentro de las 3 a 5 semanas de vida en lechones de cerdas inmunes. Durante la infección natural se observa anticuerpos específicos tipo IgM entre los 5 y 7 días, e IgG entre los 7 y 10 días post infección. Estos anticuerpos alcanzan sus niveles máximos entre los 30 y 50 días post infección y empiezan a declinar observándose animales negativos a los 300 días. Los anticuerpos en fluidos orales se pueden detectar por aproximadamente 4 meses.

Dentro de las técnicas para la detección de anticuerpos se puede utilizar ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), inmunofluorescencia (IFA), virus neutralización (VN), ensayo de inmunoperoxidasa en monocapa (IPMA), tiras de inmunocromatografía. Las ventajas de los ELISA comerciales reside en su alta sensibilidad, especificidad, y en su practicidad para tener resultados reproducibles en muy corto tiempo. La mayoría de los ELISA comerciales usan la proteínas recombinantes como diana, y como método de revelado/visualización suero anti-cerdo conjugado con peroxidasa. Los resultados en la mayoría de estas pruebas se expresan como la relación de muestra evaluadas frente a muestras positivas (S:P; sample-positive ratio), y hay que recordar que estos valores no se corresponden con título de anticuerpos. Para la detección de anticuerpos en fluidos orales se han adaptado los kits comerciales con la adición de detección de IgA. La dinámica de anticuerpos en fluidos orales es similar a la observada en suero, excepto por la presencia de IgA, la cual aparece más tempranamente y dura por mayor tiempo. Algunos kits de ELISA se han adaptado para la mejor detección de anticuerpos contra cepas locales específicas, así; por ejemplo en Europa se han evaluado kits que presentan como proteína diana la nucleoproteína del virus Lelystad o tipo 1.

Los ELISA de bloqueo se han desarrollado para la determinación de anticuerpos específicos contra los subtipos subtipo 1 y 2. Se ha evaluado también ELISA destinados a utilización de proteínas no estructurales más específicamente nsp1, nsp2 y nsp7, las cuales son altamente inmunogénicas. Se ha demostrado que anticuerpos contra estas proteínas pueden ser detectados entre 14 y 126 días post infección.

La técnica de inmunofluorescencia se realiza agregando suero de los animales problema a células infectadas con el virus de PRRS, seguido de un anticuerpo secundario anti-cerdo marcado con fluoresceína. A través de esta técnica, se puede determinar el título de anticuerpo haciendo diluciones seriadas del suero problema. Esta técnica permite determinar fácilmente la presencia de IgM e IgG. La IFA tiene buena sensibilidad y especificidad, pero puede variar entre laboratorio debido a variaciones en los protocolos, así como también por la cepas utilizadas para la infección de los cultivos celulares y la cepa inductora de anticuerpos en la infección de campo.

Esta técnica se usa generalmente para confirmar falsos positivos sospechosos a través de la técnica de ELISA. Otra característica importante de esta técnica, es que es capaz de detectar anticuerpos más temprano que la técnica de ELISA. Así la IgM en suero se puede detectar a los 5 días y la IgG entre 9 y 14 post infección. La duración de la detección de anticuerpos también difiere de la observada por la técnica de ELISA, detectándose IgM entre 28 y 30 días post infección, mientras que la IgG entre 90 y 145 días.

La técnica de virus de neutralización detecta anticuerpos capaces de neutralizar el virus de PRRS en cultivos celulares. Como norma general se incuban los suero problema con una cantidad conocida de virus. Luego de la incubación se evalúa el efecto citopático de la muestra en cultivos celulares, determinado así el suero problema presentaba anticuerpos capaces de neutralizar el virus utilizado para la prueba. La técnica de virus neutralización tiene alta especificidad pero pobre sensibilidad. Esta técnica serológica no se utiliza de rutina diagnóstica y hoy en día ha sido relegada solo a su utilización en programas de investigación. La interpretación de los resultados puede ser difícil si el virus utilizado para la neutralización no es homólogo al virus de campo que produjo la respuesta inmune. Todavía se cuestiona la real capacidad protectora de los anticuerpos neutralizantes. Los anticuerpos neutralizantes pueden aparecer a los 11 días pos infección pero generalmente no se observan hasta los 30-60 días y pueden ser detectado hasta un año de la primo infección.

Alternativas para el monitoreo del virus de PRRSV Dentro de las alternativas para el monitoreo del virus de PRRS no es sólo necesario la información referente a presencia o ausencia, o a la cantidad de virus circulante. Se debe tener información precisa de la caracterización genética para el movimiento seguro de animales entre establecimientos, para así poder evitar la diseminación de nuevas variables en establecimientos negativos o previamente infectados con cepas heterólogas.

Una de las primeras tecnologías utilizadas para la caracterización viral es la digestión a través enzimas de restricción (RFLP) de la región ORF5. Esa tecnología utiliza 3 enzimas de restricción (MluI, HincII, y SacII), las cuales cortan la secuencia nucleotídica en regiones específicas dando

así patrones específicos para cada enzima que se codifican en forma numérica. Esta tecnología fue originalmente diseñada para diferenciar cepas vacunales de cepas de campo.

Sin embargo, debido a la gran variabilidad genética y los cambios constantes durante la replicación en vivo, y mayormente la reversión observada en cepas vacunales, esta tecnología se considera cada vez menos sensitiva para establecer la relación genética entre los virus detectados. Es sabido que el cambio en un solo nucleótido puede cambiar el patrón RFLP, sin observarse cambios en la patogenicidad, tasa de replicación, o significancia clínica.

Hoy en día la variabilidad genética se evalúa a través de la secuenciación y análisis filogenético los cuales son mucho más certera y produce información exacta de la composición genética de las cepas evaluadas. La secuenciación se realiza generalmente en el segmento ORF5 pero se puede incluir también el segmento ORF6. El segmento ORF5 se considera el segmento más variable mientras la segmento ORF6 es el segmento más conservado. La evaluación del segmento ORF5 permite monitorear la evolución genética el virus de PRRSV en un establecimiento en el tiempo. La secuenciación se puede realizar con buenos resultados a partir de tejidos infectados y sueros, sin embargo los fluidos orales presentan algunos problemas debido a la presencia de enzimas que pueden inhibir la reacción de PCR y la técnica de secuenciación.

Los laboratorios diagnósticos generalmente presentan los resultados de secuenciación de ORF5 en relación porcentual con cepas referentes de los virus vacunales. Así se trata a establecer si los virus circulantes o causales de enfermedad son cepas de campo o cepas vacunales a virus vivo modificado. Una de las limitantes de esta técnica es la imposibilidad de detectar animales coinfectados. Así, animales que han sido vacunado con cepas a virus vivo modificado y que hayan sufrido una co-infección con cepas de campo, no pueden ser diagnosticados precisamente.

La información obtenida a través de la secuenciación se utiliza para la elaboración de árboles de relación genética (dendrogramas) lo cual nos sirven para establecer la introducción de nuevas cepas en la granja o la reemergencia de cepas previamente diagnosticadas. Es importante remarcar, que la secuenciación no sirve para establecer relación con la virulencia de la cepa. Otra limitante de la secuenciación de ORF5 es que comprende un segmento muy pequeño del virus aproximadamente 600 bp comparado con el genoma completo 15000 bp.

Para el monitoreo de granja es sumamente importante establecer si lo que deseamos evaluar es la detección y/o presencia comparado con la prevalencia. Establecer este objetivo claramente es sumamente importante al momento de calcular el número, así como el tipo de muestras a evaluar. Así, para la detección del virus podemos basarnos en tejidos de animales infectados donde podemos realizar la detección directa de antígeno o ácido nucleico. Sin, embargo para determinar prevalencia y monitoreo necesitamos hacer un muestreo aleatorio y representativo basado en muestras poblacionales. Una de las técnicas ampliamente difundida hoy en día para el monitoreo en granja es la colección de fluidos orales. Se colocan cuerdas en corrales aleatorios dentro de cada galpón y se detecta la presencia del virus de PRRS a través

de PCR. Esta técnica de muestreo nos permite evaluar la dinámica de la infección en la granja así como posibles variaciones genéticas en el tiempo, ya que se pueden tomar muestras más frecuentemente y evaluar un número más grande de animales. Otro sistema de monitoreo, más que nada relacionado para establecer el estatus de la granja animales reproductores, es la detección de PRRSV en fluidos de procesamiento. Muestra de testículo y cola, colectados al momento del procesamiento de las camadas, son macerados y el fluido obtenido se analiza a través de la prueba de PCR. Estas muestras nos permite tanto determinar la presencia de virus así como también realizar pruebas serológicas para la detección de anticuerpos. Por último para determinar prevalencia y dinámica de la infección se pueden hacer estudios longitudinales o cortes transversales en suero. Las muestras de suero son de utilidad para la detección de viremia y o presencia de anticuerpos. La limitante de estas muestras está basada en el tiempo y lo laborioso de la recolección de sueros individualmente en un número representativo de animales.

Finalmente con estos resultados es importante realizar una clasificación de la granja. Las granjas de animales reproductores se pueden clasificar basado en eliminación y la exposición al virus. Así, por su estado de eliminación se clasifican como negativas, dudosas y positivas.

Dudosas son aquellas granjas con resultados negativos pero insuficiente número de muestras o poder estadístico para soportar el estado de granja negativa. La exposición puede ser clasificada como negativa o positiva. Todas las granjas se consideran positivas cuando las granjas todavía no han sido evaluadas. En base a estos criterios la granja se pueden clasificar en inestable positivas (eliminación y exposición positiva), estables positivas (eliminación dudosa y es exposición positiva), estables positivas en proceso de eliminación (eliminación dudosa, disposición positiva, qué hacer empezado proceso eliminación después de haber introducido el último grupo de reproductoras seropositivas), negativas provisionales (eliminación negativa, exposición positiva), y negativas (eliminación y exposición negativa).

En conclusión diagnóstico y monitoreo del virus de PRRS es complicado debido a la naturaleza del virus, la dinámica y flujo de los animales, el avance en las distintas técnicas diagnósticas y las técnicas para prevenir la manifestación clínica. Sin embargo, los sistema de monitoreo diagnóstico de la enfermedad son esenciales para los programas de control y erradicación. Siempre es necesario confirmar los resultados de laboratorio así cómo hacer una evaluación de los mismos dentro del contexto clínico. Las nuevas técnicas moleculares nos permiten hacer evaluaciones epidemiológicas más certeras así como la detección de antígeno nos permite hacer un mejor diagnóstico de los casos clínicos. Finalmente recordemos que las pruebas serológicas nos ayudarán a determinar exposición previa. Se debe tener siempre presente y entender el objetivo del proceso diagnóstico y de monitoreo para poder aplicar la mejor rutina de muestreo y técnica más apropiada para cumplir cada uno de estos objetivos.

Fuente: Memorias del Congreso Nacional Porcino 2018