



Detección del virus del síndrome reproductivo y respiratorio en pjaras porcinas de Baja California, México



Sergio Daniel Gómez-Gómez ^a

Gilberto López-Valencia ^{a*}

José Carlomán Herrera-Ramírez ^a

Enrique Trasviña-Muñoz ^a

Francisco Javier Monge-Navarro ^a

Katty Moreno-Torres ^a

Issa Carolina García-Reynoso ^a

Gerardo Enrique Medina-Basulto ^a

Miguel Arturo Cabanillas-Gómez ^a

^a Universidad Autónoma de Baja California. Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias. Km 3.5, Carretera San Felipe, Fraccionamiento Campestre, 21386, Mexicali, Baja California, México.

*Autor de correspondencia: gilbertolopez@uabc.edu.mx

Resumen:

El objetivo de este estudio fue evaluar la presencia del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino genotipo 2 (VSRRP-2) en Baja California (Baja), así como la estandarización de la técnica qRT-PCR. Se realizó un estudio transversal de 2016 a 2017 en granjas de Baja. Se obtuvieron 97 muestras de sangre de verracos y cerdas clínicamente sanos y no vacunados. Se diseñaron y estandarizaron iniciadores con el fin de realizar pruebas qRT-PCR a partir de la capa leucocitaria. Todos los resultados positivos fueron confirmados por

estudios de secuenciación. Se encontró que el 9.3 % de las muestras fueron positivas. Las muestras positivas provinieron del 66.6 % de las regiones muestreadas. Este estudio demuestra la presencia de VSRRP-2 en Baja, por lo tanto, es necesario realizar estudios epidemiológicos para identificar la magnitud del problema y establecer medidas preventivas y de control.

Palabras clave: Detección, México, PCR, SRRP, Porcino.

Recibido: 24/08/2020

Aceptado: 29/12/2020

El síndrome reproductivo y respiratorio porcino (SRRP) es una enfermedad causada por un virus ARN, con dos genotipos conocidos actualmente: 1 (europeo) y 2 (americano)⁽¹⁾. Se transmite fácilmente por saliva, secreciones nasales, orina, semen, leche y calostro⁽²⁾. Produce fallo reproductivo, lechones nacidos débiles y enfermedades respiratorias⁽³⁾. La principal vía de introducción del virus SRRP (VSRRP) en países previamente libres es a través de movimientos de cerdos y con la introducción de semen; por lo tanto, deben establecerse protocolos para reducir el riesgo⁽⁴⁾. Cuando se introduce por primera vez en un rebaño inmunológicamente ingenuo, el virus se propaga a cerdos de todas las edades en aproximadamente 2 a 3 semanas⁽²⁾, con tasas de mortalidad de hasta 69 % en cerdos de destete⁽⁵⁾. Las pruebas diagnósticas comerciales más comunes son ELISA⁽⁶⁾ y en los últimos años, las técnicas moleculares, en particular la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real (qRT-PCR)⁽⁷⁾.

En México, el VSRRP se describió por primera vez en 1994 con una prevalencia serológica de 8.1 % en cerdos importados de Estados Unidos y Canadá⁽⁸⁾. Desde 2002, se ha reportado la presencia de múltiples variantes del VSRRP genotipo 2 (VSRRP-2) dentro de granjas porcinas en todo Sonora⁽⁹⁻¹⁰⁾, estado vecino de Baja California (Baja), y el segundo mayor productor de carne de cerdo en México. Por su parte, en Baja, la mayor producción de carne de cerdo proviene de pequeños productores de traspatio, con instalaciones hechas básicamente de materiales rústicos, con las mismas áreas utilizadas para las diferentes etapas de producción; generalmente alimentados con desechos y otros subproductos de desperdicio de alimentos; por lo general, sin programas de medicina preventiva o asesoramiento veterinario y, en la mayoría de los casos, ni siquiera con prácticas de higiene adecuadas.

El objetivo principal de este estudio fue evaluar la presencia del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino genotipo 2 en las regiones productoras de carne de cerdo

más representativas de Baja California, México, además de la estandarización de la prueba qRT-PCR para esta enfermedad.

El estudio fue aprobado por el Comité Institucional de Ética Animal, que está representado por el Grupo Académico de Salud Animal y el Grupo Académico de Diagnóstico de Enfermedades Infecciosas, ambos son parte del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias. Los propietarios de los cerdos utilizados en esta investigación fueron informados sobre el estudio y dieron su consentimiento.

Se realizó un estudio transversal en 26 granjas dentro de seis regiones de Baja: Ensenada, Mexicali, Tecate y Tijuana, así como en los valles de Mexicali y San Quintín. Las granjas fueron seleccionadas de una base de datos de la Asociación de Criadores de Cerdos de Baja California e invitadas a participar de acuerdo con su proximidad y el tamaño del rebaño. Solo se visitó a aquellos que estaban interesados. La estimación del tamaño de la muestra se realizó para la detección de una enfermedad⁽¹¹⁾, considerando una población estatal porcina de 10,315⁽¹²⁾, una sensibilidad diagnóstica del 99.5 %, una prevalencia esperada del 4 % y un nivel de confianza del 95 %.

$$n \cong \frac{(1 - (1-\alpha)^{1/F}) (N - 1/2(SeE - 1))}{Se}$$

Donde, n= tamaño de la muestra; N= tamaño de la población; E= número de enfermos; α = nivel de confianza; Se= sensibilidad de la prueba.

En consecuencia, se necesitó un tamaño de muestra de al menos 74; sin embargo, se pudo recolectar un total de 97 muestras de sangre de la vena yugular de verracos y cerdas aparentemente sanos que no participaron en la vacunación contra el VSRRP. Se utilizaron tubos estériles Vacutainer® con anticoagulante EDTA (BD, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.). Las muestras fueron transportadas al Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, después se separaron 200-300 μ l de la capa leucocitaria en tubos estériles para la extracción de ARN. La extracción de ARN se realizó utilizando el Kit de tejido graso y fibroso de ARN total Aurum™ (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN se reconstituyó a un volumen final de 30 μ L de elución preparada. El ARN se almacenó a -70 °C hasta que se realizó la prueba qRT-PCR.

Los iniciadores RT-PCR fueron diseñados para amplificar un fragmento con una longitud de 87 pb del gen de la nucleocápside contenido dentro del marco de lectura abierto 7 (ORF7) de VSRRP-2 (GenBank AF494042.1), ya que esta es la proteína viral más conservada en células de cerdo infectadas por VSRRP⁽¹³⁾. Los iniciadores fueron diseñados utilizando Primer3Plus versión 2.4, GenRunner versión 6.1 y OligoCalc versión 3.2, generando los iniciadores PRRS-USA-F 5'-CGATCCAGACTGCCTTAAAC-3' y PRRS-USA-R 3'-CACTGTGGAGTTTAGTTTGC-5'.

Las condiciones de qRT-PCR se optimizaron probando los iniciadores por triplicado a 200, 400 y 800 nM con 1, 2 y 3 μ l de ARN molde en un volumen total de 10 μ L utilizando una mezcla maestra con colorante EvaGreen[®] (Biotium, Hayward, CA, EE.UU.). La mejor eficiencia se logró mediante el uso de los iniciadores a 800 nM en 2 μ l de ARN molde y se probó a través de diluciones de diez veces para generar un análisis de curva de fusión (Figura 1) y compararlo con electroforesis en gel de agarosa. Una vez obtenida la mejor concentración, se probaron, por triplicado, 40 muestras de control positivo y 40 muestras negativas para lograr una confianza de especificidad del 95 %⁽¹⁴⁾. La sensibilidad se determinó a través de diluciones de diez veces mediante la generación de una curva estándar de 97.6 % de eficiencia, R^2 de 0.996 y pendiente de 3.25 (Figura 2).

Figura 1: Picos de amplificación de diferentes diluciones de control positivo en la temperatura de fusión previamente establecida (77.4-78.0 °C)

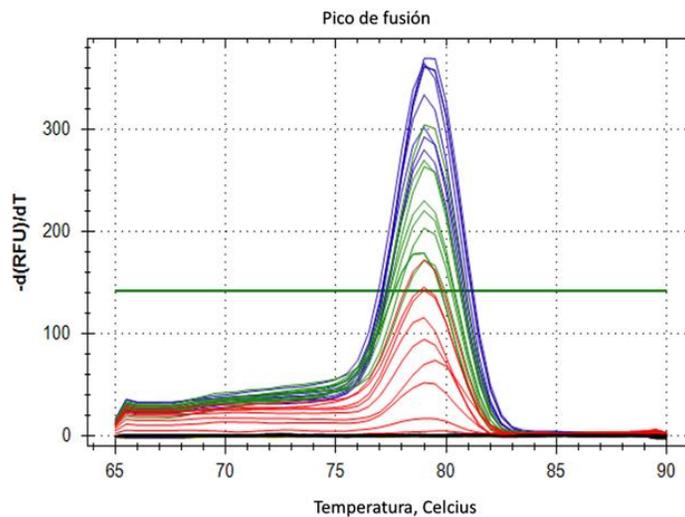
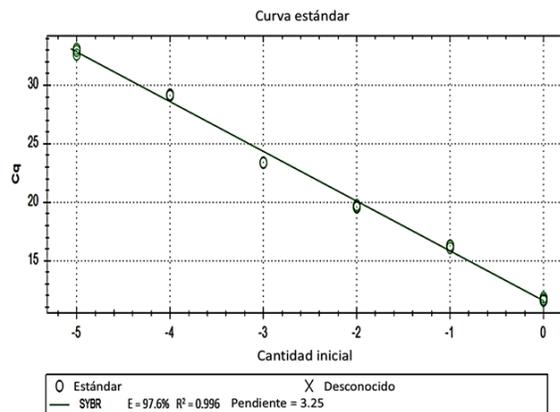
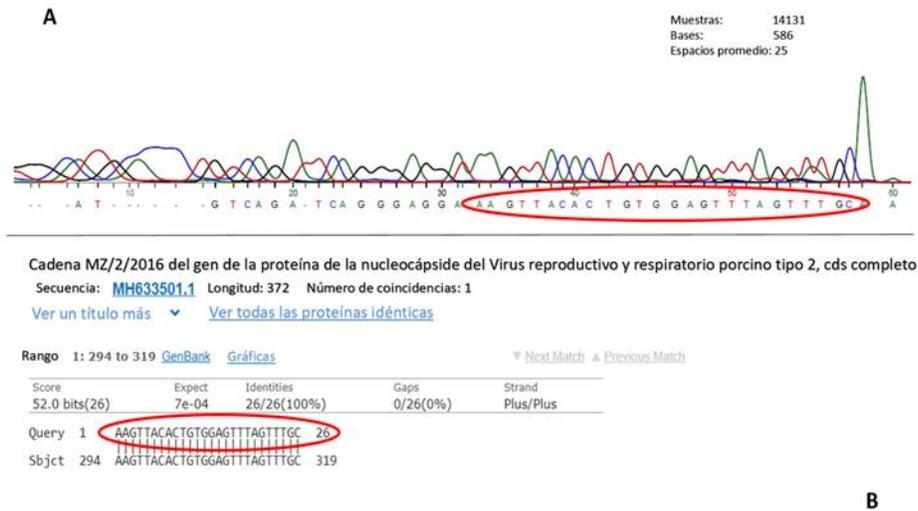


Figura 2: Curva estándar de los iniciadores diseñados



Se extrajo ARN del control positivo de la vacuna Ingelvac PRRS® MLV (Boheringer Ingelheim). Se utilizaron tres controles negativos diferentes: mezcla maestra sin ARN molde, agua de grado molecular y aire. Todas las muestras se analizaron por duplicado. Las reacciones de qRT-PCR se ejecutaron en un termociclador de tiempo real CFX96 (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.). Las reacciones de prueba consistieron en 1 µl de ARN, 400 nM de cada iniciador y mezcla maestra de iScript One Step RT-PCR con colorante EvaGreen y agua de grado molecular en un volumen total de reacción de 10 µl. Las condiciones del termociclador se calcularon utilizando el software CFX96, lo que resultó en un paso inicial de transcripción inversa a 50 °C durante 10 min, desnaturalización a 95 °C durante 3 min, 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 10 seg, alineamiento a 53.7 °C durante 25 seg y extensión a 72 °C durante 20 seg. Se realizó un análisis de la curva de fusión después de cada ejecución para confirmar la temperatura de fusión (Tm) del fragmento amplificado, calculada entre 77.4 y 78.0 °C. Las muestras positivas fueron confirmadas por secuenciación en un laboratorio externo y estas secuencias, verificadas mediante la herramienta BLAST (Figura 3).

Figura 3: Secuencia de muestras positivas y verificadas mediante la herramienta BLAST



Panel A: Resultados de secuenciación de una de las muestras positivas, resaltando una secuencia de 26 nucleótidos. Panel B: Captura de pantalla de la base de datos BLAST, que muestra los 26 nucleótidos del panel A, resaltados y que coinciden con una cepa del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino tipo 2 en el gen de la proteína nucleocápside. La base de datos arroja 100 resultados (no mostrados), todos ellos cepas de VSRRP-2.

Se encontraron 9.3 % (9/97) de muestras positivas a VSRRP-2, presentes en el 66 % (4/6) de las regiones donde se realizó el estudio. La frecuencia de casos positivos fue de 33 % (2/6)

en Tijuana, 16.6 % (3/18) en el Valle de San Quintín, 11.1 % (3/27) en Mexicali y 3.7 % (1/27) en Ensenada (Figura 4). En Tecate (0/13) y Valle de Mexicali (0/6) no hubo muestras positivas. No se encontraron ni se informaron signos de SRRP en ninguna granja.

Figura 4: Distribución geográfica del VSRRP en Baja California y la frecuencia en cada región analizada



El objetivo principal de este estudio fue evaluar la presencia del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino tipo 2 en las regiones productoras de carne de cerdo más representativas de Baja California, por lo tanto, considerando el diseño epidemiológico del estudio, se puede afirmar que VSRRP-2 está presente en Baja, con una prevalencia de al menos 4 %.

Este estudio representa el primer informe del VSRRP-2 en Baja⁽¹⁵⁾, a pesar del reporte previo de su presencia en la zona noroeste del país⁽¹⁶⁾ que incluye, además del estado de Baja, el estado de Sonora y otros cuatro estados. Es importante destacar la cercanía geográfica con Sonora así como las características de su industria porcina, ya que Sonora introduce carne de cerdo así como cerdos vivos y semen a Baja⁽¹⁷⁾, por lo que existe la posibilidad de contagio de SRRP considerando que la vacunación contra VSRRP nunca se ha implementado en Baja, ya que se supone que está libre de la enfermedad y además, la mayor proporción de pequeños productores de traspatio, que no suelen utilizar medidas primarias de medicina preventiva.

En este estudio también se diseñaron iniciadores capaces de detectar VSRRP-2 en la región ORF7, y estos resultados fueron confirmados por secuenciación, demostrando la efectividad de la prueba y la presencia de VSRRP-2 en Baja, independientemente de la falta de signos clínicos⁽¹⁸⁾. Esto podría deberse a la presencia de cepas de VSRRP de baja virulencia dentro

del territorio mexicano⁽¹⁹⁾; o a una baja concentración viral dentro de las muestras⁽²⁰⁾ dada la amplificación de las curvas positivas después del ciclo 30.

Este estudio demuestra la amplia presencia de VSRRP-2 en Baja, incluso en ausencia de signos clínicos que indiquen la presencia de la enfermedad; por lo tanto, es necesario realizar estudios epidemiológicos prospectivos con el objetivo de determinar la prevalencia y los posibles factores de riesgo asociados con el fin de identificar la magnitud del problema, así como establecer medidas preventivas y de control.

Agradecimientos

Este estudio permitió al primer autor obtener el título de Doctor en Ciencias Agropecuarias (Universidad Autónoma de Baja California). Los autores también agradecen al MVZ José Soto, Dra. Laura Kinejara, MC Arsenio Guzmán, MC Kelvin Espinoza y MC Ricardo Martínez.

Declaración de conflicto de intereses

Los autores no tienen ninguna relación financiera o personal con personas u organizaciones que puedan influir o sesgar el contenido del artículo de manera inapropiada.

Literatura citada:

1. Nan Y, Wu C, Gu G, Sun W, Zhang YJ, Zhou EM. Improved vaccine against PRRSV: Current progress and future perspective. *Front Microbiol* 2017;8:1635.
2. Pileri E, Mateu E. Review on the transmission porcine reproductive and respiratory syndrome virus between pigs and farms and impact on vaccination. *Vet Res* 2016;47:108.
3. Wang X, Marthaler D, Rovira A, Rossow S, Murtaugh MP. Emergence of a virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus in vaccinated herds in the United States. *Virus Res* 2015;210:34-41.
4. Organization of Animal Health. PRRS: the disease, its diagnosis, prevention and control. Paris: Office of International Epizootica, 2008:1-7.
5. Young B, Dewey C, Poljak Z, Rosendal T, Carman S. Clinical signs and their association with herd demographics and porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) control strategies in PRRS PCR-positive swine herds in Ontario. *Can J Vet Res* 2010;74(3):170-177.

6. Henao-Diaz A, Giménez-Lirola L, Magtoto R, Ji J, Zimmerman J. Evaluation of three commercial porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) oral fluid antibody ELISAs using samples of known status. *Res Vet Sci* 2019;125:113-118.
7. Yang Q, Xi J, Chen X, Hu S, Chen N, Qiao S, *et al.* The development of a sensitive droplet digital PCR for quantitative detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Int J Biol Macromol* 2017;104(A):1223-1228.
8. Milián SF, Cantó AGJ, Weimersheimer RJ, Coba AMA, Anaya EAM, Correa GP. Estudio seroepidemiológico para determinar la presencia de anticuerpos contra el virus del síndrome disgenésico del cerdo en México. *Tec Pecu Mex* 1994;32(3):139-144.
9. Batista L, Pijoan C, Lwamba H, Johnson CR, Murtaugh MP. Genetic diversity and possible avenues of dissemination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in two geographic regions of Mexico. *J Swine Health Prod* 2004;12:170-175.
10. Burgara-Estrella A, Reséndiz-Sandoval M, Cortey M, Mateu E, Hernández J. Temporal evolution and potential recombination events in PRRSV strains of Sonora Mexico. *Vet Microbiol* 2014;174(3-4):540-546.
11. Cannon, RM. Sense and sensitivity-designing surveys based on an imperfect test. *Prev Vet Med* 2001;49(3-4):141-63.
12. State Information Office for Sustainable Rural Development. Livestock statistical notebook, 2011-2015. Baja California, México: Ministry of Agricultural Development, 2016:19.
13. King SJ, Ooi PT, Phang LY, Nazariah Z, Allaudin B, Loh WH, *et al.* Phylogenetic characterization of genes encoding for viral envelope glycoprotein (ORF5) and nucleocapsid protein (ORF7) of porcine reproductive & respiratory syndrome virus found in Malaysia in 2013 and 2014. *BMC Vet Res* 2016;13(1):3.
14. Broeders S, Huber I, Grohmann L, Berben G, Taverniers I, Mazzara M, *et al.* Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. *Trends in Food Science & Technology* 2014;37(2):115-126.
15. National Secretary of Health Quality and Food Safety. Bulletin of the Secretary of Epidemiological Surveillance Inform, 2017. <https://www.gob.mx/senasica/documentos/boletin-sive-informa-2017>. Accessed Oct 10, 2018.

16. Martínez-Bautista NR, Sciutto-Conde E, Cervantes-Torres J, Segura-Velázquez R, Mercado-García MC, Ramírez-Mendoza H, *et al.* Phylogenetic analysis of ORF5 and ORF7 of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus and the frequency of wild-type PRRS virus in Mexico. *Transbound Emerg Dis* 2018;65(4):993-1008.
17. Extension and Territorial Innovation Group. Innovation program pig chain of GEIT livestock, Mexicali, in the State of Baja California. Baja California, Mexico: Rural Extension and Innovation Center. 2015:10.
18. Zimmerman JJ, Benfield A, Dee SA, Murtaugh MP, Stadejek T, Stevenson GW, *et al.* Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (Porcine Arterivirus). In: Zimmerman JJ, *et al.*, editors. *Diseases of swine*. 10th ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 2012:461-486.
19. Weimersheimer R, Canto AJEE, Anaya EGJ, Coba AMA, Millán SF, Correa GP. Frecuencia de anticuerpos contra el virus del síndrome disgenésico y respiratorio en cerdos sacrificados en rastros de México. *Tec Pecu Mex* 1997;35:139-144.
20. Walker NJ. A technique whose time has come. *Science* 2002;296:557-559.