

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS COLOMBIANAS DEL VIRUS DEL SÍNDROME REPRODUCTIVO Y RESPIRATORIO PORCINO

Rodríguez V., Mogollón D., Rincón M.A., Arbeláez G., Orjuela N.

Laboratorio Nacional de Diagnóstico Veterinario Medicina Porcina, Instituto Colombiano Agropecuario ICA

Recibido Octubre 16 de 2001; Retornado para modificación Noviembre 22; Aprobado Noviembre 30

RESUMEN

Por primera vez en Colombia se caracterizaron cuarenta cepas del virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino aisladas de campo, utilizando Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP). De estas cepas fueron secuenciadas cinco para establecer sus relaciones genéticas. Se encontraron tres patrones de RFLP circulando en el país: **172, 262 y 252**. Se presentó circulación simultánea en dos granjas de cepas virales con patrones de restricción **252 y 262**, a la vez que se dio el caso de animales que presentaban infecciones mixtas y se detectó el virus en muestras de fetos. Las cepas colombianas secuenciadas pertenecen al genotipo americano del VSRRP. Se discutió la importancia de estos hallazgos con relación a la epidemiología de la enfermedad en Colombia.

Palabras claves: Síndrome reproductivo y respiratorio porcino, transcripción reversa, reacción en cadena de la polimerasa anidada, polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción, secuenciación.

INTRODUCCIÓN

El Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (SRRP) es una enfermedad infecciosa de gran impacto económico debido a que causa alteraciones reproductivas que incluyen nacimiento de prematuros, incremento en el número de mortinatos, momias, nacidos débiles, severa enfermedad respiratoria en recién nacidos y cerdos postdestete e incremento de las enfermedades respiratorias secundarias en los cerdos de finalización (Zimmerman, 1998).

El virus causante del SRRP pertenece a la familia Arteriviridae, dentro de la cual se encuentra el virus de la Arteritis Equina (EAV), el virus elevador de la lactato deshidrogenasa (LDV) y el virus de la fiebre hemorrágica del simio (SHFV). El genoma del VSRRP está conformado por una molécula de ARN de cadena sencilla, polaridad positiva, de aproximadamente 15 kb. Contiene 8 marcos de lectura abiertos ORFs. El ORF 1 (1a, 1b) comprende cerca del

80% del genoma viral y codifica para la ARN polimerasa. Los ORFs 2, 3 y 4 codifican para unas proteínas asociadas al virion designadas GP2, GP3 y GP4 respectivamente. Los ORFs 5, 6 y 7 codifican la proteína de envoltura (GP5), la proteína de membrana (M) y la proteína de nucleocápside (N), respectivamente (Snijder et al., 1998).

Estudios alrededor del mundo indican que las cepas de campo del VSRRP difieren en su virulencia y son biológica, antigénica y genéticamente heterogéneas, se reconocen dos genotipos virales; el europeo y el americano (Meng, 2000).

Se han desarrollado métodos para controlar los efectos negativos del SRRP dentro de los cuales se encuentra la vacunación. Existe evidencia tanto de campo como experimental sobre la capacidad del virus de difundirse de un animal a otro, ya que algunas vacunas están preparadas con virus vivo modificado (Borner et al., 1997).

* Apartado Aéreo 29743. Bogotá

En Colombia los estudios de reactividad serológica y el aislamiento de cepas virales de campo han demostrado que la infección se halla ampliamente difundida en el país (Mogollon et al., 2000). El propósito del presente estudio fue caracterizar cuarenta cepas virales de campo aisladas en Colombia mediante la aplicación de las técnicas de RT-PCR anidada, RFLP y la secuenciación de cinco de ellas.

MATERIALES Y METODOS.

Muestras: Se procesaron un total de 130 muestras que incluyeron: macerados de pulmón, sueros y tejidos. Las muestras de macerado de pulmón fueron procesadas para aislamiento viral y las muestras de suero y tejidos para extracción de ARN viral.

Aislamiento Viral: Las cepas virales se aislaron en la línea celular MARC-145. Las células se cultivaron en Medio Mínimo Esencial Eagle (Sigma, Estados Unidos), suplementado con suero fetal bovino al 10% (Sigma, Estados Unidos) y sulfato de gentamicina 50 ug/ml (Sigma, Estados Unidos). Se adicionó a la monocapa celular 200 ul de fluido de macerado de pulmón; el inóculo fue incubado por una hora a 37°C y posteriormente aspirado. Las células se mantuvieron en el medio ya descrito por siete días a 37°C. Periódicamente se examinaron las células para determinar la presencia de efecto citopático (ECP) procedimiento empleado por el Laboratorio de Medicina Porcina ICA-CEISA.

Extracción de ARN viral: Los sobrenadantes de cultivo celular que mostraron ECP y las muestras de suero que presentaron títulos altos por ELISA, se utilizaron para la extracción del ARN viral utilizando el kit comercial QIAam viral RNA (Quiagen, Estados Unidos). Se siguió la metodología propuesta por el kit. Las muestras de tejidos se procesaron para extracción de ARN utilizando Trizol (GIBCO BRL, Estados Unidos).

Transcripción Reversa – Reacción en Cadena de la Polimerasa Anidada RT-PCR Anidado: La amplificación del marco de lectura abierto cinco (ORF5) se realizó utilizando un RT-PCR anidado, para esto se utilizaron los iniciadores externos P208F, P331R y los iniciadores internos P420F, P620R; descritos en estudios anteriores. (Umthun, et al., 1999; Wesley, et al., 1999).

La mezcla para el RT-PCR contiene buffer II 1X con tritón al 0.1%, MgCl₂ 5mM, DNTPS 0.8mM¹, P208F² 1pmol/ul, P331R² 1 pmol/ul, inhibidor de RNAsas¹, 0.1 U/ul, Taq polimerasa¹, 0.03U/ul, RT MuMLV¹, 0.5U/ul, 5ul de RNA por reacción; concentraciones finales en un volumen final de 50 ul de reacción. Las condiciones de reacción empleadas fueron las siguientes: Transcripción Reversa a 42 °C. por 1 hora, 95 °C por 5 minutos, 30 Ciclos: (94°C por 15 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 75 segundos), 72°C por 10 minutos.

La mezcla para el segundo ciclo de PCR contenía: buffer II 1X con triton al 0.1%, MgCl₂ 3mM, DNTPS¹ 0.8mM, P420F² 1pmol/ul, P620R² 1 pmol/ul, Taq polimerasa¹, 0.03U/ul, 2 ul del producto del primer PCR; concentraciones finales en un volumen final de 50 ul de reacción. Las condiciones de reacción empleadas fueron las siguientes: 30 Ciclos: (94°C por 15 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 75 segundos), 72°C por 10 minutos.

RFLP para el ORF 5 del VSRRP: Para cada muestra se preparó una premezcla de digestión con las enzimas SacII, MluI y HincII, empleando cada enzima por separado. Las enzimas estaban a una concentración de 2U/ml y el producto de amplificación del ORF 5 a una concentración de 10ug en un volumen final de reacción de 10 ul, la solución se homogenizó y finalmente se incubó la reacción a 37°C por 2 horas.

Secuenciación: Se sometieron cinco muestras a secuenciación automática en Estados Unidos por el laboratorio SEQUWRIGHT, utilizando el secuenciador ABI3700 Applied Biosystem.

RESULTADOS

Por la técnica de RT-PCR anidado 130 muestras fueron positivas para el VSRRP. De las cuarenta muestras 17 provenían de muestras de suero, 17 de sobrenadantes de cultivo celular y 6 de tejidos que incluían 3 muestras de fetos. Un resultado positivo por dicha técnica permitió la observación en un gel de agarosa al 1.5% de una banda de ADN de 716pb. Figura 1.

¹ Promega (EEUU)

² Gibco (EEUU)

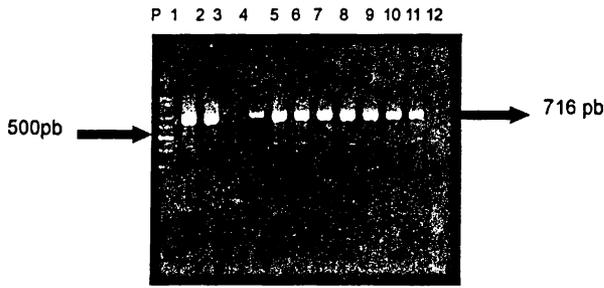


Figura 1. Resultado Positivo por RT-PCR Anidada para el virus del SRRP. El orden de las muestras en el gel es el siguiente: P. Patrón de Peso Molecular. Carriles 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10. Muestras positivas por RT-PCR Anidada para PRRSV. Obsérvese fragmento de 716pb. Carril 11. Control Positivo. Cepa de Referencia VR 2332. Obsérvese fragmento de 716pb. Carril 12. Control Negativo. Ausencia del fragmento de 716pb.

Las muestras positivas por RT-PCR anidado se sometieron a digestión con las enzimas de restricción MluI, Hinc II y Sac II. Con los patrones obtenidos se estableció un código de tres números para cada cepa de acuerdo a estudios descritos previamente (Umthun et al., 1999; Wesley et al., 1999). El primero, segundo y tercer número representan el resultado obtenido con Mlu I, Hinc II y Sac II respectivamente.

La digestión con la enzima Mlu I permitió la obtención de dos diferentes patrones de restricción : 1 y 2. Figura 2.

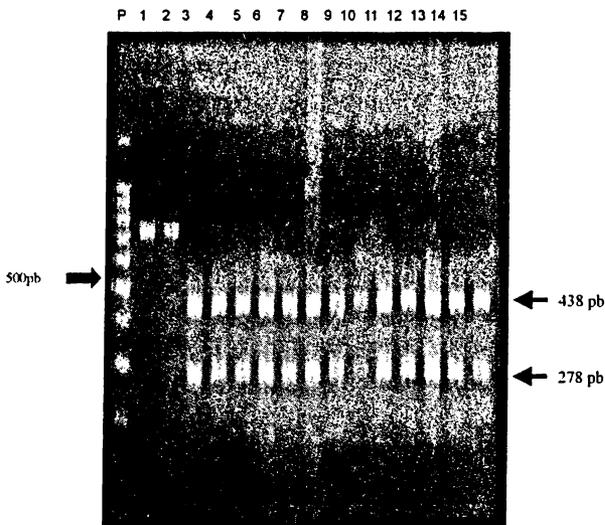


Figura 2. Patrones de Restricción Obtenidos con la Enzima MluI. El orden de las muestras examinadas en el gel fue el siguiente: P. Patrón de peso Molecular. Carriles 1 y 2. Patrón de restricción 1. Fragmento de peso molecular de 716pb. Carriles 3 – 14. Patrón de restricción 2. Fragmentos de 438 pb y 278 pb. Carril 15. Patrón de restricción 2. Cepa de referencia ATCC VR 2332.

Con la enzima de restricción Hinc II se encontraron tres diferentes patrones de restricción 5, 6 y 7, cuatro muestras presentaron simultáneamente el patrón de restricción 5 y 6. Figura 3.

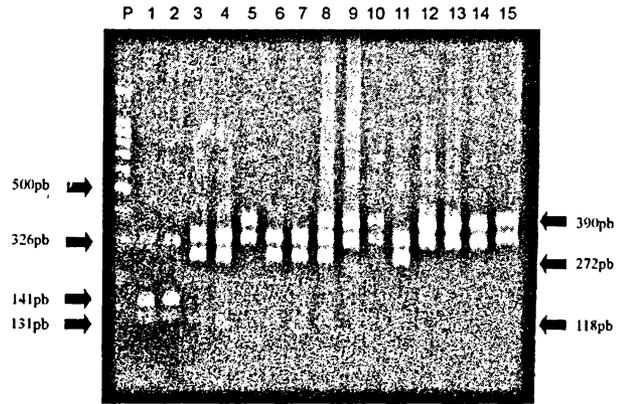


Figura 3. Patrones de Restricción Obtenidos con la Enzima. Hinc II. El orden de los patrones de restricción en el gel es el siguiente: P. Patrón de Peso Molecular. Carriles 1 y 2. Patrón de Restricción 7. Fragmentos de 326 pb , 141 pb, 131 pb y 118 pb. Carriles 3, 4, 6, 7, y 11. Patrón de Restricción 6. Fragmentos de 326 pb, 272 pb y 118 pb. Carriles 5, 9, 10, 12, 13, 14. Patrón de restricción 5. Fragmentos de 326 pb y 390 pb. Carril 8. Muestra que presenta el patrón de restricción 5 y 6. Fragmentos de 390 pb, 326 pb, 272 pb y 118 pb. Carril 15. Patrón de Restricción 5 Cepa de referencia ATCC VR 2332.

La digestión con la enzima de restricción SacII permitió la obtención de un solo patrón de restricción para todas las muestras: 2. Figura 4.

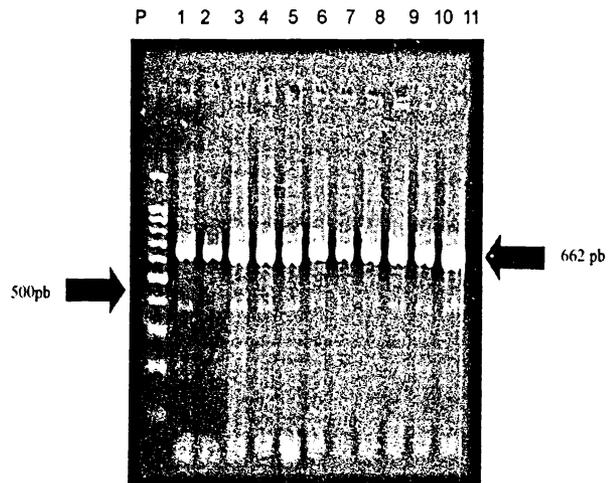


Figura 4. Patrones de Restricción Obtenidos con la Enzima Sac II. El orden de los patrones de restricción en el gel fue el siguiente: P. Patrón de peso Molecular. Carriles 1 – 10. Patrón de Restricción 2. Fragmentos de 662pb y 54 pb. Carril 11. Cepa de referencia VR2332. Patrón 2.

De un total de 40 muestras, 2 presentaron el patrón de restricción 172 (5%), 23 muestras el patrón 262(57.5%) y 15 muestras el patrón 252(37.5%). El patrón de restricción de las cepas control utilizadas ATCC VR2332 fue de 252 y de igual forma para el virus vacunal.

Un total de cinco muestras se analizaron por secuenciación por el laboratorio SEQUWRIGHT en Estados Unidos, utilizando el equipo ABI3700 Applied Biosystem. Para su selección se tuvo en cuenta el patrón de restricción, su ubicación geográfica y la historia de vacunación de la granja en el momento de la toma de muestra (Tabla 1).

Tabla 1. Relación de muestras seleccionadas para secuenciar.

MUESTRA	VACUNACION	DEPARTAMENTO	PATRON DE RFLP
1.2976 - Col	No	Valle	172
2.12. Col	No	Atlántico	262
3.2063 -Col	No	Atlántico	252
4.9. -Col	No	Cundinamarca	262
5.189-41 -Col	No	Antioquia	252

Con el propósito de establecer comparaciones se obtuvo la información de la secuencia de nucleótidos del ORF 5 de 20 cepas virales del virus del PRRS descritas en el Gen Bank. Posteriormente se realizó un BLAST para identificar zonas de homología utilizando el programa Bio edit Sequence Alignment Editor (Estados Unidos), logrando de esta forma la generación de un árbol de distancias genéticas para las secuencias Colombianas y las de referencia (Figura 5).

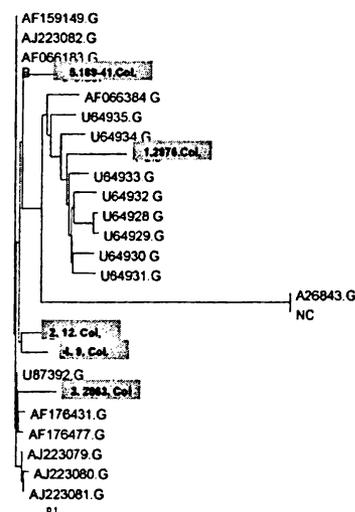


Figura 5. Dendrograma de las cepas secuenciadas en el presente trabajo y de las cepas de referencia del Gen Bank del Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino.

El dendrograma de distancias genéticas permitió observar que las cepas 2.12.col y 4.9.col provenientes de dos granjas diferentes fueron clasificadas en un mismo grupo y genéticamente muy cercanas a cepas de procedencia americana. La cepa 3.2063.col que tenía patrón de restricción 252 se consideró muy cercana de un grupo de cepas Norte ame-

ricanas. La cepa 5.189-41 col con patrón de restricción 252 se encontraron genéticamente muy relacionada con el virus vacunal. Estas cepas tienen entre sí una distancia genética inferior al 10%. La cepa 1.2976.col tiene una distancia genética de aproximadamente el 15% en relación con las cuatro cepas y se encontró relacionada con aislados canadienses con los que mantiene una distancia genética del 10%.

ricanas. La cepa 5.189-41 col con patrón de restricción 252 se encontraron genéticamente muy relacionada con el virus vacunal. Estas cepas tienen entre sí una distancia genética inferior al 10%. La cepa 1.2976.col tiene una distancia genética de aproximadamente el 15% en relación con las cuatro cepas y se encontró relacionada con aislados canadienses con los que mantiene una distancia genética del 10%.

DISCUSIÓN

Al Centro Nacional de Referencia Diagnóstica del Instituto Colombiano agropecuario ICA, llegan de manera aleatoria muestras de granjas para ser analizadas para el SRRP, dichas granjas tienen como antecedentes manifestaciones clínicas y reproductivas que sugieren la posible presencia del virus del SRRP en la granja.

La técnica de transcripción reversa - reacción en cadena de la Polimerasa Anidada, permitió la amplificación del ORF 5 del virus del SRRP en muestras de campo al visualizarse una banda de un peso molecular de 716 pb. Esta técnica ofrece como ventajas el aumento de la sensibilidad y la especificidad al utilizar dos reacciones consecutivas de PCR; el aumento de la sensibilidad se debe a la reamplificación del primer amplicón, mientras que el aumento de la especificidad se da por el éxito que haya tenido la primera reacción de PCR.

Los patrones de restricción detectados en este trabajo fueron 252, 262 y 172. Los patrones de restricción 252 y 262 se hallaron distribuidos en granjas de los diferentes departamentos estudiados. El patrón de restricción 172 se encontró presente en dos muestras provenientes de una misma granja en el mismo departamento. Sería interesante examinar otros aislamientos de esta región para determinar si este patrón está limitado a esta zona del país.

En dos de las granjas se encontraron circulando simultáneamente tanto el patrón de restricción 252 como el 262, a la vez se puede observar que tres de las cuatro muestras que presentan el posible patrón de infección mixta pertenecen a estas dos granjas. El patrón de restricción del virus vacunal (252) se presentó con una alta frecuencia en las muestras analizadas, lo que lleva a pensar en la posibilidad de vacunación reciente o que se hayan introducido animales positivos importados o comprados de granjas donde circula el virus vacunal. Sin embargo, cerca del 80% de las muestras estu-

diadas provenían de granjas no vacunadas, se puede inferir que los animales que entraron a estas granjas habían estado en contacto con cerdos vacunados, o infectados con cepas relacionadas con el subtipo americano

El patrón de RFLP que se encontró en mayor porcentaje fue el **262**. A las cepas que presentan este patrón de restricción, se les considera estrechamente relacionadas con el virus vacunal (Umthun, et al, 1999). Se sugiere que bajo ciertas condiciones, el virus vacunal puede persistir, mutar y eventualmente convertirse en una variante que produzca respuesta clínica en los cerdos (Mengeling et al., 1999).

Es evidente que la caracterización de cepas virales del SRRP utilizando la técnica de RFLP, es una valiosa herramienta en estudios epidemiológicos y es útil para diferenciar cepas individuales en casos de infección por cepas múltiples del virus del SRRP (Wesley, et al, 1998). En cuatro muestras analizadas en el presente estudio, se observó una posible infección mixta, por encontrarse simultáneamente el patrón de RFLP **252** y **262**. La alta mutación, recombinación y variación entre cepas del virus del SRRP (Faaberg et al., 1999; Wesley et al., 1999), hace posible que en una granja se encuentre más de una cepa viral circulante, como fue el caso de dos granjas de este estudio, sugiriendo infección mixta, asociada seguramente con factores ambientales, de manejo y de estado sanitario propios de las granjas.

Se encontró además que tres de las muestras analizadas provenían de tejidos de fetos muertos y se comprobó en estas muestras la presencia del virus del SRRP con patrón de restricción **262**. El virus vacunal y las cepas de campo pueden atravesar la placenta e infectar los fetos ocasionando, aborto, mortinatos y momias (Mengeling, et al, 1999). La infección congénita puede resultar en infección persistente, con la probabilidad de que se propague el virus después del nacimiento y la eventual mutación del virus. Además se puede sugerir que en el campo se estén presentando problemas reproductivos asociados con la presencia de estas cepas.

Numerosas investigaciones han demostrado que el virus del SRRP es genéticamente heterogéneo (Meng, 2000). El análisis de las secuencias muestra dos genotipos mayores: el europeo y el americano, y dentro de estos genotipos, menores o variantes (Meng, 2000). De acuerdo con los hallazgos de la presente investigación las cinco cepas Colombianas secuenciadas se pueden catalogar como pertenecientes al genotipo americano, lo cual puede relacionarse con la im-

portación de pie de cría procedente de Estados Unidos y Canadá ó la utilización de vacuna elaborada con la cepa de referencia americana ATCC VR 2332.

Se debe enfatizar que el presente estudio fue realizado utilizando iniciadores específicos para cepas americanas por lo cual se sugiere incluir iniciadores específicos para cepas europeas ya que no se puede descartar que estas estén circulando en el país, máxime si se tiene en cuenta que en Colombia se importa pie de cría y cerdas de reemplazo europea.

CONCLUSIONES

Se encontraron tres patrones de RFLP: **172**, **262** y **252**, en 40 cepas aisladas del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino SRRP.

En dos granjas se encontró circulando simultáneamente dos patrones de RFLP, el **252** y el **262**, a la vez que se da el caso de animales que presentan infecciones mixtas por cepas virales con estos patrones de restricción.

Se identificaron cepas aisladas de fetos lo que sugiere que en condiciones de campo el virus puede estar asociado a problemas reproductivos ocasionados por la presencia del virus vacunal circulando en la granja ó por la inadecuada utilización del esquema de vacunación.

El dendrograma de distancias genéticas para los RFLP permitió ubicar las muestras en tres conglomerados diferentes pero todos pertenecientes a un mismo clon.

La secuenciación permitió ubicar las cepas Colombianas estudiadas dentro del genotipo americano.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos al: Instituto Colombiano Agropecuario, Asociación Colombiana de Porcicultores, Fondo Nacional de la Porcicultura y a la Pontificia Universidad Javeriana.

BIBLIOGRAFÍA

1. Borner A and Strabyaard B. Appearance of acute PRRS like symptoms in sows after vaccination with a modified live PRRS vaccine. *Vet Res*, 1997.
2. Faaberg K, Yuan S, Schmidt B and Murtaugh M. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: Detection of viral recombination. *American Association of Swine Practitioners*. 403-408, 1999.
3. Meng XJ. Heterogeneity of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future vaccine development. *Vet Microbiol*. 7: 310-329, 2000
4. Mengeling W, Lager K and Vorwald A. Safety and efficacy of vaccination of pregnant gilts against porcine reproductive and respiratory syndrome. *Am J Vet Res*. 60:796-801, 1999.
5. Mengeling W, Vordwald A, Lager K, Clouser B and Wesley R. Identification and clinical assessment of suspected vaccine-related field strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Am J Vet Res*. 60:334-340, 1999.
6. Mogollón D, Rincón M, Arbeláez G, Orjuela N, Ruiz S and Corredor J. Isolation of Porcine Reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in Colombia. The 16th International Pig Veterinary Society Congress, Melbourne, Australia. 642, 2000.
7. Snijder E, Meulenberg J. The Molecular biology of arteriviruses. *J Gen Vir*. 79:961-979, 1998.
8. Umthun A and Mengeling W. Restriction fragment length polymorphism analysis of strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by use of a nested-set reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Am J Vet Res*. 60:802-806, 1999
9. Wesley R, Mengeling W, Lager K, Clouser D, Landgraf J, Frey M. Evidence for divergence of restriction fragment length polymorphism following in vivo replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Am J Vet Res*. 60: 463-767, 1999.
10. Wesley R. Differentiation of a porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine strain from North American field strains by restriction fragment length polymorphism analysis of ORF 5. *J Vet Diag Invest*. 10: 140-144, 1998.
11. Zimmerman J. PRRS Compendium. National Pork Producers Council, 1998.