

DETECCIÓN DEL VIRUS DEL SÍNDROME REPRODUCTIVO Y RESPIRATORIO PORCINO (SRRP) Y DE LA PESTE PORCINA CLÁSICA (PPC) EN MUESTRAS DE CERDOS MEDIANTE LA TÉCNICA RT-PCR ANIDADA

Lora A, Mogollón D, Rincón MA, Ruiz S

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

Recibido 29-11-02; Retornado para modificaciones 11-02-03; Aprobado 26-05-03

RESUMEN

El propósito de este trabajo fue detectar el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (SRRP) y el virus de la peste porcina clásica (PPC) en muestras clínicas como: semen, suero y tejidos, de cerdos mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa anidada (RT-PCR). En este trabajo se realizaron dos ensayos, uno experimental en el cual se estudió la respuesta serológica de lechones convencionales infectados experimentalmente con el virus del SRRP y al mismo tiempo se detectó mediante la técnica de RT-PCR, la presencia del genoma viral en los tejidos. Los resultados de este ensayo demuestran que el virus del SRRP hace viremia y se disemina a los órganos linfoides antes que el cerdo haya producido anticuerpos. La viremia fue detectada desde 7 días postinoculación y los anticuerpos hasta el día 9 postinoculación. Por otro lado, se realizó un estudio tomando muestras al azar de semen y suero de reproductores, aparentemente sanos, en condiciones de campo de diferentes granjas del país. A estas muestras se les realizó estudio serológico, utilizando la prueba de ELISA para el SRRP y PPC, aislamiento viral para el SRRP en células MARC-145 y RT-PCR para el virus del SRRP y de la PPC. Los resultados de este ensayo demostraron que la presencia de anticuerpos contra el virus del SRRP, no necesariamente indican que el cerdo esté cursando o no con un proceso infeccioso, ya que se presentan valores S/P de ELISA variados. En cuanto al ELISA de PPC, los anticuerpos son altos en la mayoría de las muestras, debiéndose esto probablemente a la vacunación. No se logró aislar el virus del SRRP en las muestras de suero mediante el cultivo celular. El ARN viral del SRRP y del virus de la PPC se detectó en el semen de algunos reproductores, pero no se logró detectar en suero. Este resultado nos indica que el virus del SRRP y de la PPC pueden encontrarse persistentemente en el semen de cerdos reproductores, pudiendo actuar como portadores sanos, convirtiéndose en una fuente de infección para otros animales susceptibles.

Palabras claves: Síndrome reproductivo y respiratorio porcino, peste porcina clásica, transcripción reversa, reacción en cadena de la polimerasa anidada, ELISA.

INTRODUCCIÓN

El síndrome reproductivo y respiratorio porcino (SRRP), es una de las enfermedades más dramáticas y devastadoras que afectan la industria porcina. Es una enfermedad de reciente aparición, detectada en Estados Unidos en 1987 y en Europa en 1991 (Meulenberg, 1998; Meng, 2000). Las pérdidas económicas son consecuencia de una elevada tasa de mortinatos y fetos momificados, de una disminución en el número de lechones destetos por cerda/año, del incremento en el intervalo entre partos, de las altas tasas de reemplazo y de severos problemas respiratorios en el prelevante y levanteceba que causan retraso en el crecimiento.

Aunque la vía primaria de transmisión del virus del SRRP es a través del contacto directo, recientes investigaciones en el Reino Unido han demostrado que los reproductores pueden transmitir el virus en el semen (Meulenberg, 1998). Esta información es muy importante en la industria porcina en la cual la inseminación artificial es relevante en la producción de nuevos genes de un alto nivel de salud (Benfield et al., 2000).

De otro lado, la peste porcina clásica (PPC) es una enfermedad infecciosa altamente contagiosa. Esta enfermedad cursa de manera aguda con procesos hemorrágico-septicémicos o

de forma subaguda o crónica con alteraciones clínicas y anatopatológicas variables predominando los cuadros crónicos o atípicos de la enfermedad (Dhale et al., 1992). El impacto económico en nuestro medio esta representado por la alta mortalidad en animales no vacunados, abortos, baja ganancia de peso y la presentación de epizootias cíclicas por la presencia de animales portadores asintomáticos. La excreción del virus de la PPC en el semen y su transmisión vía inseminación artificial ha sido demostrada a través de la inoculación experimental de reproductores (Smit et al., 1999).

La inseminación artificial en la especie porcina se ha desarrollado y expandido a nivel de granjas, lo cual tiene gran importancia, ya que este método de reproducción se ha impuesto frente a la monta natural por ciertas ventajas como: la disminución del número de reproductores en la granja, utilización de reproductores de alta calidad genética, explotación al máximo del manejo de lotes o grupos, obtención de porcentajes de fertilidad iguales o superiores a los obtenidos con monta natural, reducción del manejo del trabajo/monta, mejoramiento del control de calidad del semen y mejor control sanitario. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que el simple hecho de separar machos de hembras y de realizar la inseminación artificial no controla el riesgo sanitario, si no se toman otras medidas en paralelo (Glossop, 1995; Dee et al., 2001). Actualmente no se está utilizando en el país una técnica rápida, sensible y confiable para detectar los virus del SRRP y de la PPC en el semen, por lo cual la implementación de la técnica RT-PCR se hace necesaria si se tienen en cuenta las pérdidas que pueden ocasionar en una explotación el uso de semen contaminado con estos agentes.

El objetivo de este trabajo de investigación fue detectar el virus de SRRP y el virus de PPC en muestras de semen, suero y tejidos de cerdos en condiciones experimentales y de campo, mediante la técnica RT-PCR anidada, para establecer el significado de los hallazgos en relación con la eficiencia reproductiva de las granjas de cría.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño Experimental: Se realizaron dos ensayos; uno se realizó en lechones infectados experimentalmente con el virus del SRRP, en los cuales se detectó la diseminación del virus del SRRP hacia diferentes órganos y a sangre y se evaluó la respuesta inmune humoral mediante la prueba de ELISA. Para este ensayo se utilizaron 18 cerdos de seis semanas de edad provenientes de una granja negativa al SRRP. Se seleccionaron 12 animales que se infectaron intranasalmente con la cepa del SRRP VR-2332 con un inóculo que contenía 10^7 TCID50/

ml (Grupo inoculado). También se incluyó un grupo control de no tratamiento, el cual incluía 6 lechones (Grupo control). Los animales experimentales se alojaron en unidades de aislamiento totalmente separadas. Una semana antes de comenzar con el experimento, a todos los animales se les colectó sangre. Con las muestras de suero se realizó la prueba ELISA IDEXX (IDEXX Laboratories, USA), para tener la seguridad de que los valores S/P de anticuerpos fueran negativos. Posteriormente, se infectó por vía intranasal con el virus del SRRP a 12 cerdos. El día 7 de la infección se seleccionaron: dos animales del grupo inoculado y un animal del grupo control, a los cuales se les realizaron los siguientes procedimientos:

Se colectaron muestras de sangre, los animales se sacrificaron y se tomaron: pulmones, tonsila, bazo, ganglio linfático; en bolsas estériles y cada órgano en bolsa aparte. Todo este procedimiento se repitió a los 8, 9, 21, 36 días postinoculación. En el momento en que ya el experimento había llegado a su final, teniendo ya todas las muestras de suero y tejidos recolectadas y guardadas a -70°C, se les realizó la prueba de ELISA IDEXX para el SRRP y la RT-PCR anidada para el SRRP en cada una de las muestras de suero, pulmón, tonsila, bazo+ganglio linfático, colectadas según la evolución del experimento. También se tomaron en cuenta los signos clínicos que presentaron los animales, parámetros como: la temperatura rectal, el aumento de los ganglios linfáticos y el estado físico de cada animal, durante los días posteriores a la inoculación.

La segunda parte del presente trabajo se realizó en reproductores porcinos de campo, provenientes de once granjas del país provenientes de los departamentos de: Antioquia, Caldas, Cundinamarca, Meta y Valle, de las cuales se colectaron 99 muestras de semen y 44 suero de un total de 51 reproductores. Estas muestras se utilizaron para la detección del virus del SRRP por medio de la técnica de RT-PCR anidada con cebadores dirigidos al gen ORF7 (Christopher-Hennings et al., 1995). En el caso de la PPC se realizó RT-PCR anidada con los cebadores dirigidos al gen E2, sólo con muestras de semen (Lowings., 1996; Paton et al., 2000). A las muestras de suero se les realizó detección de anticuerpos mediante la técnica de ELISA; ELISA IDEXX para el SRRP y ELISA Ceditest (DLO Institute for Animal Science and Health, Holanda) para PPC. Además se realizaron cultivos celulares de muestras de suero en células MARC-145, para determinar la presencia del virus del SRRP, evidenciándolo por medio del efecto citopático en las células (Horter et al., 2002).

Con los resultados de laboratorio se realizaron análisis estadísticos descriptivos no paramétricos comparando los resultados con la epidemiología de la enfermedad y se hicieron

inferencias prácticas para los productores y profesionales del sector.

Virus: Para el ensayo experimental doce lechones fueron inoculados por la vía intranasal con una suspensión del virus del SRRP de la cepa viral ATCC VR-2332 (donada por la Universidad de Minnesota), empleando una dosis de 10⁷ TCID 50/ml. Esta dosis se preparó previo cultivo de la cepa de referencia ATCC VR-2332 en células MARC-145.

Controles: Los controles positivos utilizados para las pruebas de PCR realizadas para el virus del SRRP fueron la cepa de referencia VR-2332 y la vacuna Ingelvac PRRS MLV (Laboratorio Boehringer Ingelheim). De las dos se obtuvo mejor resultado con la cepa VR-2332. Para la PCR de PPC se utilizó como control positivo un ARN extraído de un tejido de un animal infectado con el aislamiento de desafío (Aislamiento Santander, ICA). Como control negativo se utilizó en ambos casos agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC).

Procesamiento de las muestras: Las muestras de semen se recolectaron en recipientes estériles, luego fueron enviadas al laboratorio lo antes posible en refrigeración. Cuando llegaron al laboratorio se alicuotaron, luego se centrifugaron a 610 g durante 20 minutos. De esta, se obtuvieron el sedimento (fracción celular) y el sobrenadante (líquido seminal). Este último se dispensó en otro tubo y se guardó a -70°C. La fracción celular se lavó una vez con PBS pH 7 tratado con dietilpirocarbonato (DEPC) y luego se resuspendería en 500ml de PBS, el cual se volvió a resuspender posteriormente con el Trizol (GIBCO BRL, Estados Unidos) para guardarlo a -70°C. Otra forma que se ensayó fue trabajar con la fracción celular sin lavar, a la cual se le agregó directamente 1 ml de Trizol. En resumen, la fracción celular se utilizó para la detección del virus del SRRP (Christopher-Hennings et al., 1995) y tanto la fracción celular como el líquido seminal para la detección del virus de PPC (Floegel et al., 2000).

Las muestras de sangre fueron centrifugadas para obtener los sueros correspondientes. Luego se congelaron a -70°C en alicuotas, para posteriormente realizar las pruebas de ELISA para el SRRP y PPC y la extracción de ARN.

ELISA para el virus del SRRP: Se siguió el protocolo propuesto por el kit IDEXX Herdcheck. La presencia o ausencia de anticuerpos contra el virus del SRRP se determinó calculando el coeficiente S/P de cada muestra. Si el coeficiente S/P era superior o igual a 0.4, la muestra se clasificaba como positiva para anticuerpos SRRP.

ELISA para el virus de la PPC: Se siguió el protocolo propuesto por el kit Ceditest CSFV. Los resultados fueron interpretados como porcentaje de inhibición (PI). PI \geq 50% la prueba es positiva para anticuerpos contra PPC.

Cultivo Celular: Las cepas virales fueron aisladas en la línea celular MARC-145. Las células crecieron en el medio mínimo esencial Eagle (Sigma, Estados Unidos), suplementado con suero fetal bovino al 10% (Sigma, Estados Unidos) y sulfato de gentamicina 50mg/ml. Posteriormente se inocularon 100ml de suero en cada pozo y en otro pozo una dilución 1/2. La placa se llevó a adsorción a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ durante 1 hora. Se adicionaron 100ml más de medio a los pozos inoculados y se llevó a incubar a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Las células se observaron diariamente durante 4-5 días, para observar efecto citopático y realizar posteriormente inmunofluorescencia (Horter et al., 2002).

Extracción de ARN viral: La extracción de ARN viral de las muestras de tejidos y la fracción celular del semen se realizó por el método del Trizol (GIBCO BRL, Estados Unidos), que es una modificación del método del tiocianato de Guadiana descrito por Chomczynski y Sacchi (1987). Para la extracción de los sueros y de los líquidos seminales, se siguió el protocolo del kit de QiAmp viral RNA (Qiagen, Estados Unidos) para purificación de ARN viral. Se siguió la metodología propuesta por el kit.

RT-PCR para el virus del SRRP: Se realizó una RT-PCR inicial de un solo paso, en la cual se agregó 1ml de ARN previamente extraído a una mezcla que contenía: MgCl₂ 2.6mM, buffer de PCR 1X, dNTPs (Promega, Estados Unidos) 0.2mM, cebadores 1 y 2 (Invitrogen Life Technologies, Estados Unidos) cada uno en una concentración de 0.15mM, inhibidor Rnasin (Promega, Estados Unidos) 0.02 U/ml, MU-MLV (Promega, Estados Unidos) 0.5 U/ml y Taq polimerasa (Promega, Estados Unidos) 0.02 U/ml y agua DEPC hasta completar un volumen final de 50ml. Se llevó al termociclador (Perkin Elmer Gene PCR system 2400) en las siguientes condiciones: 1 ciclo a 42°C por 15 minutos y 95°C por 5 minutos, luego 30 ciclos con una denaturación inicial de 95°C por 25 segundos, anillamiento a 58°C por 5 segundos y una extensión a 74°C por 25 segundos y una extensión final a 74°C por 10 minutos.

Para realizar la segunda ronda de PCR, se agregaron 2ml del producto obtenido de la RT-PCR a una mezcla que contenía: MgCl₂ 3mM, buffer de PCR 1.6X, dNTPs (Promega, Estados Unidos) 0.3mM, cebadores 3 y 4 (Invitrogen Life Technologies, Estados Unidos) 0.3mM de cada uno y Taq

polimerasa (Promega, Estados Unidos) 0.03 U/ml, hasta completar un volumen de 50ml con agua. Posteriormente se llevaron al termociclador en las siguientes condiciones: Denaturación inicial de 95°C por 5 minutos, 30 ciclos de 95°C por 25 segundos, 60°C por 10 segundos, 74°C por 25 segundos y una extensión final a 74°C por 10 minutos. Las secuencias de los cebadores utilizados ya han sido reportadas en la literatura (Christopher-Hennings et al., 1995).

RT- PCR para el virus de PPC: Inicialmente se realizó la transcripción reversa de la siguiente manera: 5 ml de ARN fueron mezclados con 1ml de random hexamers (Promega, Estados Unidos) de 30 ng/ml. Esta mezcla se desnaturalizó a 70°C durante 5 minutos en el termociclador (Perkin Elmer Gene PCR system 2400). Luego se agregó la mezcla que contenía los siguientes reactivos: buffer RT (Promega, Estados Unidos) 1X, dNTPs (Promega, Estados Unidos) 5mM, RNasin (Promega, Estados Unidos) 1U/ml, M-MLV (Promega, Estados Unidos) 5 U/ml, hasta completar un volumen final de 20ml con agua DEPC. Esta mezcla se llevó al termociclador a 42°C por 60 minutos y 94°C por 5 minutos.

Para la primera ronda de PCR, se tomaron 2ml de ADNc obtenido en la RT y se le agregó luego una mezcla que contenía: MgCl₂ 1.5 mM, buffer de PCR 1X, dNTPs (Promega, Estados Unidos) 0.2 mM, cebador E2a (GIBCO BRL; Estados Unidos) y E2b (GIBCO BRL; Estados Unidos) 2mM de cada uno. Taq polimerasa (Promega, Estados Unidos) 0.02 U/L y se agregó agua hasta completar un volumen de 50ml. Se llevó al termociclador, haciendo semi hot start a 80°C, con las siguientes condiciones: denaturación inicial a 94°C por 5 minutos, 20 ciclos a: 94°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto y una extensión final a 72°C por 10 minutos. La segunda ronda de PCR se realizó tomando 2ml del producto de la PCR 1, al cual se le agregó una mezcla que contenía las mismas concentraciones de MgCl₂, buffer de PCR, dNTPs y Taq polimerasa de la primera ronda, pero en este caso se le adicionaron los cebadores E2c (GIBCO BRL; Estados Unidos) y E2d (GIBCO BRL; Estados Unidos), también en una concentración de 0.2 mM cada uno, se llevó al termociclador, haciendo semi hot start a 80°C con una denaturación inicial a 94°C por 5 minutos y 30 ciclos a: 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto y una extensión final a 72°C por 10 minutos. Las secuencias de los cebadores utilizados en esta prueba ya han sido descritas anteriormente (Lowings et al., 1996; Paton et al., 2000).

Electroforesis: La detección de los productos de PCR se realizó en gel de agarosa al 2%, éste se coloreó con bromuro de etidio 2 mg por 2ml.

RESULTADOS

1. Resultados lechones inoculados experimentalmente con el virus del SRRP

Signos Clínicos

Se evidenció una ligera elevación de la temperatura (valores entre 38.7 a 39.9 °C). No obstante, los animales siguieron ingiriendo alimento y no presentaron una marcada linfadenopatía.

ELISA para el virus del SRRP

A los 7 y 8 días postinoculación, los valores S/P de anticuerpos permanecieron negativos para el grupo inoculado y el grupo control (Fig. 1). A partir del día 9 postinoculación se presentan valores S/P positivos, es decir mayores de 0.4 en el grupo inoculado. El grupo control demostró resultados negativos, desde el primer al último día del experimento. El promedio el día 8 fue de 0.140 ± 0.05 , el día 9 de 0.663 ± 0.17 , el día 21 de 0.887 ± 0.04 y el día 36 de 1.335 ± 0.20 , demostrando que los valores S/P del grupo inoculado aumentaron a medida que pasaron los días (Fig. 1).

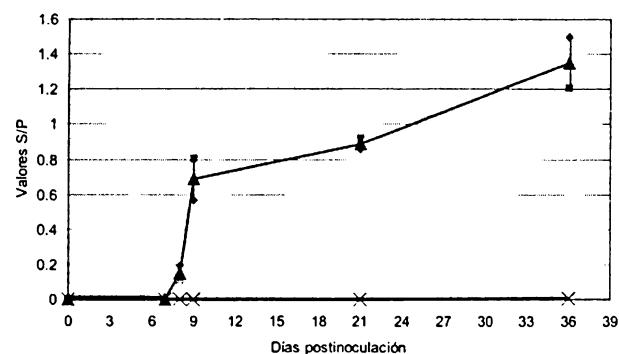


Figura 1. Resultados Prueba de ELISA en la Infección Experimental de lechones convencionales con el virus del SRRP.

Media; Desviación Estándar: Grupo inoculado: x Grupo control. En los días 7 y 8 los valores S/P permanecen negativos para el grupo inoculado con el virus. A partir del día 9 al 36 los valores S/P aumentan, siendo positivos. El grupo control permaneció negativo durante todo el experimento. Los valores S/P del grupo inoculado aumentaron a medida que pasaron los días.

RT- PCR para el virus del SRRP

En el experimento con los lechones la RT-PCR logró detectar el virus del SRRP en las muestras de suero, pulmón, tonsila, ganglio linfático+bazo, a los 7, 8, 9, 21, 36 dpi. El grupo control fue negativo para todas las muestras durante todos los días muestreados (Fig. 2).

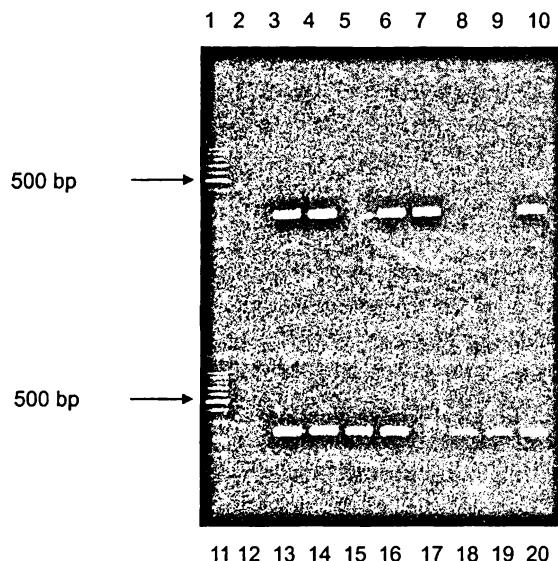


Figura 2. Detección del virus del SRRP mediante RT-PCR en muestras de órganos de algunos de los lechones inoculados experimentalmente. 1,11 Patrón de peso molecular de 100 bp. 2,12 Control negativo (agua DEPC). 3,4,6,7 tonsilas grupo inoculado. 5,8,9 tonsilas grupo control. 10,20 Control positivo (cepa VR-2332). 12,13,14,15,16,18,19 bazo+ganglio linfático grupo inoculado. 17. bazo+ganglio linfático grupo control.

2. Resultados SRRP reproductores de campo

ELISA para el virus del SRRP

Se obtuvieron una gran variedad de resultados de valores S/P. En un total de 44 muestras de suero, 13 muestras fueron positivas ($S/P > 0.4$), es decir el 29.5%. Mientras que 31 fueron negativas ($S/P < 0.4$), lo cual correspondía al 70.4%. Se obtuvo un promedio de 0.341 ± 0.6 .

Tabla 1. Detección del virus del SRRP por RT-PCR en el semen de cerdos de campo

Granja #	Departamento	Vacunación SRRP	Número de muestras de semen positivas
11	Valle	Si	2
10	Meta	No	2
6	Cundinamarca	Si	1
2	Caldas	No	1

Cultivo Celular

Todos los sueros y sus diluciones que fueron inoculados en las células MARC-145 dieron resultados negativos por efecto citopático. Es decir no se logró ningún aislamiento viral del SRRP.

RT- PCR para el virus del SRRP

El ensayo realizado en las muestras de semen de los reproductores en condiciones de campo, se obtuvieron resultados positivos en seis de un total de 99 muestras ensayadas (Tab. 1). Todas las muestras de suero dieron resultados negativos. En la figura 3 se observa el producto de 236 bp obtenido de la cepa VR-2332, el control negativo (agua DEPC), muestras de semen positivas y negativas y el patrón de peso molecular de 100 bp.

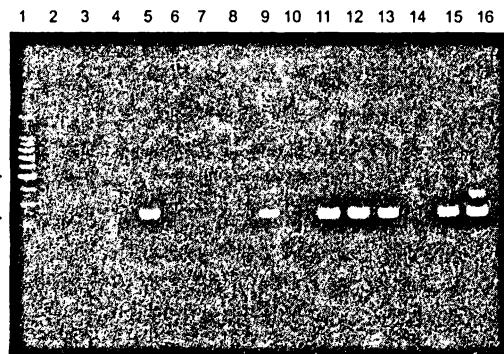


Figura 3. Detección del virus del SRRP en muestras de semen de reproductores por RT-PCR. 1. Patrón de peso molecular de 100 bp. 2. Control negativo (agua DEPC). 3,4 Semen positivo de la granja11. 6,7,8 Semen negativos. 9. Semen positivo granja11. 10. Semen negativo. 11,12 Semen positivos granja10. 13. Semen positivo granja6. 14. Semen negativo. 15. Semen positivo granja2. 16. Control positivo (cepa VR-2332)

3. Resultados PPC reproductores de campo

ELISA para el virus de PPC

Se estudiaron 44 muestras de suero, de las cuales 31 fueron positivas (valores 51-100%) lo cual corresponde al 71% de la población muestreada; 4 fueron sospechosas (valores entre 20-37%) el 9%, y 9 resultados negativos (valores < 51%), que corresponde al 20% de los animales examinados.

RT- PCR para el virus de PPC

En la figura 4 se observa el producto de 271 bp que se obtuvo en esta prueba para un resultado positivo de PPC, en este caso el aislado Santander-ICA y el control negativo y el patrón de peso molecular de 100 bp. En esta prueba se encontraron resultados positivos en tres muestras de semen de un total de 99 ensayadas, provenientes de la granja #4 proveniente del departamento de Cundinamarca. Las demás muestras de semen dieron resultados negativos.

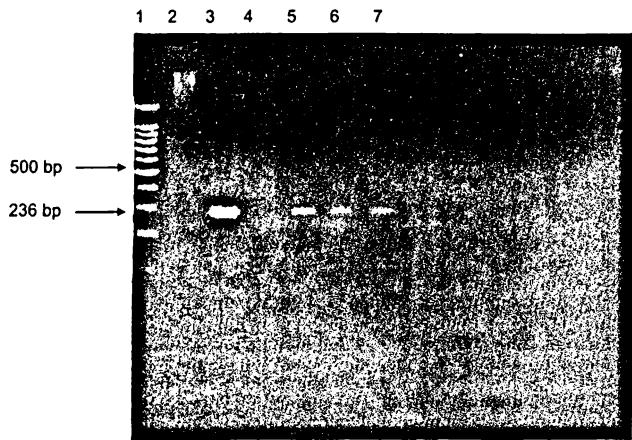


Figura 4. Detección del virus de la PPC en muestras de semen obtenidas de reproductores porcinos en condiciones de campo por RT-PCR. 1. Patrón de peso molecular de 100 bp. 2. Semen negativo. 3. Control positivo (Aislamiento Santander-ICA). 4. Control negativo (agua DEPC). 5,6,7 Semen positivos granja

DISCUSIÓN

El presente trabajo demostró una vez más la utilidad de la prueba de Reacción en cadena de la polimerasa anidada (RT-PCR) para la detección de agentes virales en muestras de semen, suero y tejidos de animales infectados en forma natural o experimental.

En el ensayo en los lechones infectados experimentalmente con el virus de referencia del SRRP se detectó del virus por RT-PCR desde el día 7 postinoculación hasta el último día del experimento, es decir el día 36, tanto en sangre (suero), tejido linfoide y pulmón. Este hallazgo contrasta con la aparición de anticuerpos que se encontraron desde el día 9 postinoculación. Claramente se demostró que el virus se detectó por RT-PCR antes que el cerdo empezara a producir anticuerpos. Estos resultados están de acuerdo con lo reportado por otros autores (Dee et al., 2002; Horts et al., 2002b) los cuales observaron que el período de aparición de anticuerpos es de 9 a 14 días postinoculación. Esto indica que la RT-PCR es una prueba sensible, que puede detectar si un animal está infectado, sin importar si presenta o no un alto título de anticuerpos; esto es importante en los estadios tempranos de la infección, en los que la viremia se produce 1 a 9 días postinfección (Christopher-Hennings et al., 1995b).

Se debe destacar en este estudio experimental la relación que hubo entre la detección del virus en el suero por RT-PCR y los títulos serológicos de ELISA medidos en valores S/P. Los valores S/P obtenidos en el presente trabajo experimental fueron comparables a la situación natural de campo descrita

por otros autores (Cuartero et al., 2002), los cuales han demostrado que no existe asociación entre los títulos ELISA S/P y la viremia (título viral). Estos hallazgos llaman la atención por la interpretación que a nivel de campo dan los profesionales a los títulos S/P de ELISA donde siempre los valores S/P altos se usan como indicadores de viremia. En el estudio experimental los animales examinados a pesar de que tenían una infección con el virus del SRRP no presentaron cambios clínicos significativos. Esto contrasta con lo que sucede en el campo donde la carga de infección bacteriana en el medio ambiente es alta y el animal puede sufrir infecciones oportunistas con bacterias como el *Streptococcus suis* o la *Pasteurella multocida* tipo A, presentando una sintomatología y retraso en el crecimiento. Los resultados de las muestras de los órganos linfoideos como la tonsila, ganglio linfático, bazo, reafirman que este virus se disemina a estos órganos. Por lo tanto, los órganos linfoideos servirían para detectar infecciones persistentes en los cerdos, pero para fines prácticos de diagnóstico, estas muestras no son fáciles de obtener sin evitar el sacrificio de los animales; pero el semen (Christopher-Hennings et al., 1995b; 2001b), la biopsia o el raspado de la tonsila (Fairbanks et al., 2002), si pueden ser útiles para detectar portadores persistentemente infectados.

De otro lado, por primera vez en el país se realizó un estudio para la detección del virus del SRRP y de la PPC en el semen de reproductores porcinos. Los resultados de RT-PCR con las muestras de suero fueron todos negativos, lo cual sugiere que a pesar que tenían lecturas S/P de ELISA un promedio de 0.341 ± 0.6 , los cerdos en ese momento no estaban virémicos.

Como se había mencionado anteriormente, los resultados con el cultivo celular en las células MARC-145 de muestras de suero, fueron negativos por efecto citopático y por inmunofluorescencia. Este resultado está de acuerdo con lo obtenido con la RT-PCR, pero cabe destacar que el cultivo celular requiere del virus infeccioso completo y activo para que pueda multiplicarse en las células, y por lo tanto se pueda aislar; cuestión que no ocurre con la PCR que con sólo una pequeña cantidad de ARN viral se puede inferir si un animal está infectado o no. La detección del virus del SRRP en las muestras de semen y no en las de suero, podría sugerir que este virus se encuentra de forma persistente en el testículo y por ende en el semen lo cual ya ha sido descrito anteriormente (Christopher-Hennings et al., 1995b; 1997; 2001a). Además estos reproductores se encontraban aparentemente en buenas condiciones de salud, sin signo de enfermedad. Se puede asumir entonces que estos animales están actuando como portadores sanos, persistentemente infectados, que mantienen el virus en la granja y pueden transmitir la infección a otros ani-

males susceptibles. Estos hallazgos tienen una gran importancia desde el punto de vista epidemiológico ya que la identificación de portadores persistentes es esencial para el control y prevención de la enfermedad.

El uso de semen de reproductores infectados para la inseminación de cerdas de reemplazo seronegativas ha demostrado la seroconversión de estos animales (Christopher-Hennings et al., 2001b). Por lo tanto sería recomendable que en el país se tuviera en cuenta el monitoreo periódico de los reproductores que se utilizan en inseminación artificial.

Analizando la respuesta serológica contra el virus del SRRP mediante la prueba de ELISA-IDEXX se concluyó que los valores S/P altos, medios o bajos, no indican que hay un proceso infeccioso en ese momento.

En el trabajo también se detectó el virus de la PPC en 3 de las 99 muestras de semen pertenecientes a la granja #4 del departamento de Cundinamarca. La detección del ARN viral del virus de PPC indica que este virus podría ser excretado vía semen, lo cual es muy importante para la reproducción porcina, ya que este virus también puede ocasionar infección persistente (Sierra et al., 1994; Van Oirschot et al 1999), al igual que el virus del SRRP, sin producir sintomatología aparente. Actualmente se reconoce que los animales persistentemente infectados pueden ser fuente de infección tanto para las madres, y éstas una vez infectadas para los lechones concebidos con semen de estos machos, ya que el virus de la PPC produce infección congénita persistente, donde los lechones nacen aparentemente sanos pero virémicos (Sierra et al., 1994). El resultado de la prueba sugiere que el virus de PPC que se detectó es vacunal, ya que la vacunación para PPC es obligatoria para todas las granjas porcícolas del país como medida de prevención y control. Se desconoce si se trata de virus infectivo (completo) o ARN viral. Los estudios en la literatura no revelan casos naturales donde se haya detectado el virus vacunal en el semen, sólo demuestran que el virus de campo si puede estar presente en el semen cuando el virus ingresa a centros de inseminación y puede diseminarse a una población de cerdas que sean inseminadas, llevando al síndrome de cerda portadora persistente (Smit et al., 1999).

La prueba de ELISA Ceditest para PPC, demostró que el 71% de los cerdos muestrados poseen anticuerpos, lo cual se asocia a la respuesta postvacunal. El intento de aislamiento viral a partir de semen en cultivos celulares tiene serias dificultades por la toxicidad del semen, la distribución homogénea del virus en el semen o la contaminación bacteriana. Por lo tanto los hallazgos del presente trabajo permiten recomendar la técnica de RT-PCR para el monitoreo de reproductores

porcinos en Centros de Inseminación, por su alta especificidad, sensibilidad, facilidad para su realización y rápidos resultados.

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. Chomzynski P and Sachi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159. 1987.
2. Christopher-Hennings J, Nelson JK, Hines RJ, Swenson SL, Zimmerman JJ, Katz JB, Yaeger MJ, Chase C and Benfield DA. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boar semen by PCR. *J.Clin.Microbiol.* 33:1730-1734. 1995a.
3. Christopher-Hennings J, Nelson JK, Hines RJ, Swenson SL, Zimmerman JJ, Katz JB, Yaeger, MJ, Chase C and Benfield DA. Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in serum and semen of adult boars. *J.Vet. Diagn. Invest.* 7:456-464. 1995b.
4. Christopher-Hennings J, Nelson EA, Nelson JK and Benfield DA. Effects of a modified-live virus vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome in boars. *Am J Vet Res.* 58:40-45.1997.
5. Christopher-Hennings J. Monitoring for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in the boar stud. *J Swine Health and Prod.*:186-188. 2001a.
6. Christopher-Hennings J, Holler L, Benfield DA and Nelson EA. Detection and duration of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen, serum, peripheral blood mononuclear cells and tissues from Yorkshire, Hampshire and Landrace boars. *J.Vet. Diagn. Invest.* 13:133-142. 2001b.
7. Cuartero L, Dee S, Deen J, Ruiz A and Pijoan, C. Association between clinical signs and high serum titers of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) in nursery pigs under field conditions. *J. Swine Health Prod.* 10:119-122. 2002.
8. Dee S and Deen J. Establishment of PRRS virus ELISA-negative boar population using previously exposed boars. *Vet. Rec.* 149:678-680. 2001.
9. Dee SA, Bierk MD, Deen J and Molitor TH. An evaluation of test and removal for the elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from 5 swine farms. *Can. J. Vet. Res.* 55:22-27. 2002.

10. Dhaled J. and Liess B. A review on classical swine fever virus infections in pigs epizootiology, clinical disease and pathology. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 15:203. 1992.
11. Fairbanks K, Chase C and Benfield DA. Tonsil biopsies and polymerase chain reaction assay for detection of breeding age gilts persistently infected with Porcine reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *J. Swine Health Prod.* 10:87-88. 2002.
12. Floegel G, Wehrend A, Depner KR, Fritzemeier J, Waberski D and Moening V. Detection of Classical Swine Fever virus in semen of infected boars. *Vet. Microbiol.* 77:109-116. 2000.
13. Horter DC, Pogranichnyi R, Chang C-C, Yoon K-J and Zimmerman JJ. Assessment of PRRS diagnostics in detecting persistently infected animals. The 17 th Congress of the International Pig Veterinary Society: June 2-5. Iowa state University. Ames, Iowa, USA. pp.210. 2002a.
14. Horter DC, Pogranichnyi RM, Chang C, Evans RB, Yoon KJ and Zimmerman J. Characterization of the carrier state in porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Microbiol.* 86:213-228. 2002b.
15. Lowings P, Ibata G, Needham J and Paton D. Classical Swine Fever diversity and evolution. *J. Gen. Virol.* 77: 1311-1321. 1996.
16. Meng XJ. Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications of current vaccine efficacy and future vaccine development. *Vet Microbiol.* 74:309-329. 2000.
17. Mengeling WL, Lager KM, Vorwald AC, Wesley R and Clouser F. An update of research at the national animal disease center on current field strains of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. Allen D. Leman Swine Conference: 138-145. 1997.
18. Meulenberg JJM. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), molecular characterization of the agent. Proceedinds of the 15 th IPVS Congress, Birmingham. England: 143-147. 1998a.
19. Paton DJ, McGoldrick A, Wilke G, Parchariyanon S, Song JY, Liou PP, Stadejek T, Lowings JP, Björklund and Belák S. Genetic typing of classical swine fever virus. *Vet Microbiol.* 73: 137-157. 2000.
20. Sierra M, Martin J, Sánchez C and Quezada M. Características clínicas y anatomo-patológicas de la Peste porcina clásica. *Aula Veterinaria.* 22:19-26. 1994.
21. Smit De AJ, Bouma A, Terspela C and Van Oirschot JT. Transmission of classical swine fever virus by artificial insemination. *Vet. Microbiol.* 67:239-249. 1999.
22. Van Oirschot JT, Straw B, D'Allaire S, Mengeling W and Taylor D. Diseases of swine. Classical Swine Fever (Hog Cholera) 8th. Edition. pp.159-172. 1999a.