

Raspados de tonsilas (RT) para la detección del virus del PRRS en cerdos en crecimiento en condiciones de campo

HEATHER L. WALKER¹; ANDREW S. BOWMAN¹; JULIANA B. FERREIRA²; SARAH W. NELSON¹; MONIQUE PAIRIS-GARCIA²; ANDREA G. ARRUDA¹.

¹Department of Veterinary Preventive Medicine, College of Veterinary Medicine, The Ohio State University, Columbus, Ohio (Estados Unidos).

²Department of Population Health and Pathobiology, College of Veterinary Medicine, North Carolina State University, Raleigh, North Carolina (Estados Unidos).

FUENTE: Walker HL, Bowman AS, Ferreira JB, Nelson SW, Pairis-García M, Arruda AG. Tonsil scrapings (TS) for porcine reproductive and respiratory syndrome virus detection in growing pigs under field conditions. *J Swine Health Prod.* 2021;29(2):72-80.

RESUMEN

Objetivo

El objetivo principal de este estudio fue describir el uso y las limitaciones de los raspados de amígdalas, tonsilas, (RT), fluidos orales (FO), hisopos nasales (HN) e hisopos ambientales (HA) para detectar el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV).



IMÁGEN 1 Hisopo nasal en cerdo.

Materiales y métodos

En este estudio se registraron dos granjas de cerdos en crecimiento positivas al PRRSV que utilizan diferentes estrategias de control de PRRSV. El muestreo comenzó aproximadamente 52 y 21 días después de la exposición al PRRSV para las granjas 1 y 2, respectivamente, y se

realizó una vez al mes durante cuatro meses utilizando un muestreo espacial fijo. Las muestras para FO y HA se recogieron a nivel de corral y las muestras de RT y HN se recogieron a nivel individual. Todas las muestras se analizaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR).

Resultados

Se recolectaron un total de 192 muestras durante el período de estudio: 48 RT, 48 FO, 48 HN, y 48 HA. En total, 20 RT (41.6%), 0 FO (0.0%), 6 HN (12.5%), y 1 HA (2.1%) fueron positivas a la RT-PCR para PRRSV a lo largo de este estudio.

Implicaciones

Las muestras de raspado de tonsilas produjeron resultados positivos a la RA-PCR de PRRSV durante períodos de tiempo más prolongados en comparación con FO, HN, y HA para la detección de PRRSV en cerdos en crecimiento. Las muestras de raspado dieron positivo en RT-PCR para PRRSV hasta 168 días después de la exposición. Los métodos de muestreo de fluidos orales, HN y HA para la detección de PRRSV en poblaciones de cerdos en crecimiento, particularmente meses después de la infección o vacunación inicial, deben usarse con precaución debido a las bajas muestras positivas para RT-PCR encontradas en este estudio.

INTRODUCCIÓN

El síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) es la enfermedad más costosa que afecta actualmente a la industria porcina de medio mundo con un daño financiero estimado en más de 600 millones de dólares anuales en Estados Unidos¹.

Esta enfermedad es causada por un virus ARN del mismo nombre y tiene dos cepas predominantes que afectan a la industria porcina en todo el mundo: la cepa euroasiática (tipo I) y la cepa norteamericana (tipo II), ambas encontradas en los Estados Unidos. La cepa del virus del PRRS de tipo II (PRRSv) es la más prevalente en América del Norte y, por lo tanto, es más probable que cause brotes². Como su nombre indica, el virus se manifiesta clínicamente principalmente en dos sistemas corporales: los sistemas reproductivo y respiratorio. En las fases de crecimiento



y finalización, los cerdos afectados muestran tasas de crecimiento más lentas, menor conversión alimenticia y una apariencia general debilitada³.

Un equipo de investigadores estimó que los cerdos de engorde/finalización endémicamente infectados con PRRSv podrían resultar en una mortalidad elevada y una disminución de la ganancia diaria promedio de 17 a 35 g/d, lo que en última instancia conduciría a una pérdida anual proyectada de 360 millones de dólares en ingresos¹.

El virus del PRRS tiene la capacidad innata de residir y proliferar en el sistema linfático⁴ y, después de infectar a un huésped, el virus pasa por varias fases en las que viaja e infecta varios órganos linfáticos (p. Ej., bazo, timo y amígdalas)³. La diseminación corporal del virus permite el desarrollo de viremia y la diseminación viral a través de una variedad de rutas que incluyen saliva, secreciones nasales, secreciones de glándulas mamarias, orina, heces y semen³. Aunque estas excreciones pueden usarse para detectar PRRSv en personas infectadas y animales, la duración de la muda para cada ruta suele ser corta, transitoria o ambas. Es importante determinar con precisión el estado del PRRSv a nivel del rebaño para el movimiento de animales y la prevención y el control de enfermedades. Como tal, los protocolos de prueba a nivel de piara se aplican comúnmente para describir el estado de enfermedad de una piara en base a pruebas de diagnóstico de una muestra de población de la piara⁶.

Los métodos de detección más utilizados para declarar el estado a nivel de piara de PRRSv en poblaciones de cerdos en crecimiento incluyen pruebas de suero y fluido

oral (FO)⁷. Aunque el muestreo de suero es el estándar de oro para la determinación del estado de PRRSv en cerdos en crecimiento⁶, la prueba de FO se ha vuelto popular en los últimos años porque es un tipo de muestra conveniente que puede realizar el personal de la granja con una capacitación mínima. Las pruebas de fluidos orales han demostrado con éxito una detección de virus del 90% al 100% mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) entre los 7 y 21 días posteriores a la infección (dpi); sin embargo, la sensibilidad de las pruebas de FO para PRRSv es negativamente proporcional al tiempo posterior a la exposición⁸ y representa un desafío para la detección una vez que PRRSv alcanza niveles bajos a nivel de población. En tales casos, debido a la posibilidad de falsos negativos, un rebaño podría declararse incorrectamente como negativo para el PRRSv, lo que podría tener consecuencias posteriores relacionadas con la propagación y la vigilancia de la enfermedad. En el pasado, también se han investigado métodos de muestreo adicionales para PRRSv, incluidos hisopos nasales (HN) e hisopos ambientales (HA). Sin embargo, los estudios han demostrado que la diseminación nasal puede ser dependiente de la cepa, solo se detecta a través de RT-PCR de forma esporádica^{9,10} y a un máximo de 49 dpi¹¹. A diferencia de HN, Vilalta y colegas¹² informaron que el frotis en el entorno del parto permitía para la detección de PRRSv hasta 14 y 17 semanas después de la exposición en el procesamiento y el destete, respectivamente. >

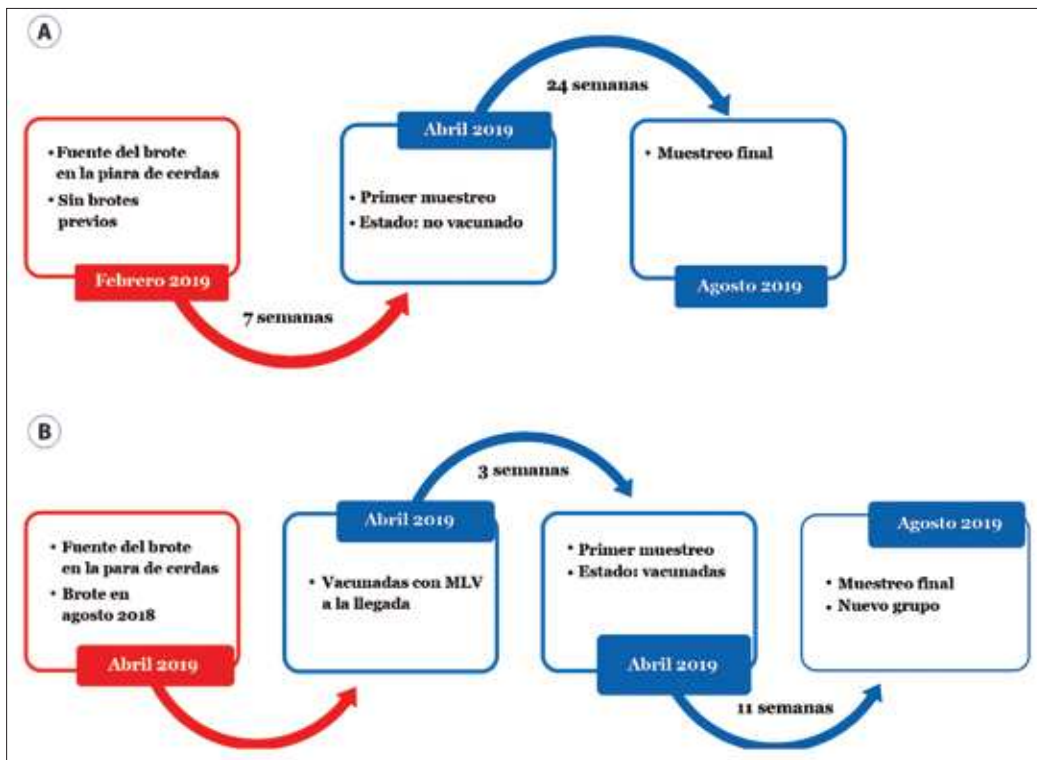


FIGURA 1 Cronograma para las estrategias de manejo del síndrome respiratorio y reproductivo porcino y muestreo para A) granja 1 y B) granja 2. Los cerdos de la granja 2 fueron vacunados con una vacuna viva modificada disponible comercialmente (MLV). Debido al momento de las recolecciones, la granja 2 estaba en proceso de enviar los cerdos al mercado durante las recolecciones de junio y julio; así, se colocó un nuevo grupo de cerdos (siguiendo el mismo protocolo de vacunación) antes de la última recolección en agosto.

Se ha demostrado en condiciones experimentales que el PRRSv puede persistir en los tejidos linfoides durante largos períodos de tiempo¹³ y puede detectarse por encima de 150 dpi¹⁴; pero por razones prácticas, el muestreo de tejido linfóide no se considera comúnmente entre las estrategias para determinar el estado de PRRSv a nivel de rebaño⁶. El raspado de tonsilas (RT) puede ser una alternativa a la recolección de tejido linfóide y ha sido validado como el método de muestreo de elección para diversas enfermedades animales¹⁵. Además, el muestreo de amígdalas puede ser eficaz para aislar PRRSv en cerdos infectados durante períodos de tiempo más prolongados. Wills et al⁴ informaron inicialmente el aislamiento de PRRSv de cerdos inoculados experimentalmente a través de muestras de RT hasta 157 dpi. Además, Allende et al¹⁶ midieron la persistencia viral de la infección experimental por PRRSv en un pequeño grupo de cerdos a través de muestras de biopsia de amígdalas de hasta 150 dpi y otros¹³ han detectado PRRSv en muestras de amígdalas a 251 dpi.

Aunque estos estudios demuestran la eficacia del RA para la detección de PRRSv, hasta la fecha no se han publicado estudios que utilicen esta metodología en condiciones de campo. Por lo tanto, el objetivo principal de este estudio fue describir el uso y las limitaciones de RT, FO, HN y HA para detectar PRRSv y comparar la detección de PRRSv en muestras de RT de una granja vacunada y no vacunada contra PRRSv.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este proyecto de investigación fue aprobado bajo el protocolo IACUC 18-167-T de la Universidad Estatal de Carolina del Norte, Estados Unidos.

Descriptores de granjas

En este estudio se inscribieron dos granjas ubicadas en Carolina del Norte (Estados Unidos). Los criterios de inclusión incluyeron granjas ubicadas a tres horas en coche que tuvieron un brote de PRRSv dentro de los 60 días previos al inicio del estudio. La primera granja (granja 1; sin vacunar) era una instalación de destete a finalización de 3.500 cabezas de un solo origen, compuesta por cuatro establos con flujo de cerdos todo dentro/todo fuera. Se presumió que la granja de cerdas de origen fue negativa para PRRSv, ya que nunca se informaron brotes de PRRS antes de este estudio. A fines de febrero de 2019, se confirmó un brote de PRRS en la granja de origen con un polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción de virus (RFLP) tipo 1-7-4. La transferencia de cerdos de la granja de origen a la granja 1 ocurrió durante todo el mes de marzo. No se administró ninguna vacuna contra el PRRSv antes o en el momento del brote en la granja de cerdas de origen o en la granja 1. La segunda granja (granja 2; vacunada) era una instalación de finalización de 2.800 cabezas de una sola fuente que también estaba compuesta por cuatro establos utilizando un flujo todo dentro/todo fuera. El grupo de cerdas de origen tenía antecedentes de brotes de PRRS con PRRSv RFLP tipo 1-7-4; y los dos

últimos brotes confirmados de PRRS ocurrieron en agosto de 2018 y abril de 2019. Debido a la confirmación previa de PRRSv, ya se había implementado un protocolo de vacunación en la granja de cerdas de origen: las cerdas se vacunaron cuatro veces al año y los lechones se vacunaron en el procesamiento (4 -6 días de edad), con una dosis de 2 ml y 1 ml de una vacuna viva modificada contra el PRRS (MLV; *Ingelvac PRRS MLV*; Boehringer Ingelheim), respectivamente.

Tras el descubrimiento del brote del mes de abril de 2019, el personal de la granja inmediatamente comenzó a vacunar al grupo de cerdas de origen con el MLV e implementó el cierre del hato. Estas estrategias de manejo, junto con los tiempos de recolección de muestras, se muestran en la *Figura 1*.

Sample collection

El muestreo para las granjas 1 y 2 se realizó entre los meses de mayo y agosto de 2019, con hasta cuatro eventos de muestreo para cada finca. La granja 1 se dividió en 44 corrales por establo y la granja 2 se dividió en 36 corrales por establo; cada corral constaba de 15 a 20 cerdos (*Figura 2*). Este estudio utilizó una técnica de muestreo espacial fijo para la recolección de la muestra¹⁷ con marcadores colocados dentro de cada establo para indicar las áreas de muestreo (*Figura 2*), lo que representa aproximadamente de 30 a 40 cerdos por área de muestreo (dos corrales de 15-20 cerdos compartiendo una división que permitía el contacto nariz a nariz).

Se eligieron ocho áreas de muestreo (que representan dos corrales cada una) en cada granja, dos por establo. Durante cada visita mensual¹⁴, se recolectaron tipos de muestra de cada área de muestreo: FO, RT, HN y HA. Todos los corrales muestreados contenían poblaciones de cerdos sanos. Las muestras de FO y HA se recolectaron a nivel de grupo. Los fluidos orales se recolectaron colocando una cuerda en la puerta de metal de dos corrales contiguos

durante aproximadamente 15 a 20 minutos para permitir que los cerdos masticasen la cuerda, como se indica en la literatura anterior¹⁸. Luego se colocó el extremo de la cuerda en una bolsa de plástico para recoger los fluidos y verterlos en un vial de vidrio para su posterior procesamiento. Las muestras se recogieron limpiando los comederos y bebederos con una gasa como se describió anteriormente¹². La gasa se colocó luego en un vial que contenía 10 ml de un medio de infusión cerebro-corazón (BHI) para su posterior procesamiento. Los RT y HN se recogieron de un animal individual en el corral usando restricción física con una trampa y sin ninguna selección específica.

Para la recolección de RT, se usó un espéculo de metal para abrir la boca del cerdo y una cuchara de metal alargada se usó para raspar la región orofaríngea a lo largo de la amígdala palatina del cerdo⁴; el líquido orofaríngeo recogido en la cuchara se transfirió a un vial que contenía 3 ml de medio BHI con la ayuda de un hisopo de algodón estéril, como se describe en trabajos anteriores⁴. El espéculo se desinfectó con toallitas Lysol o Clorox antes de cada uso, y se utilizó una cuchara nueva con cada nueva recogida de RT. Después de recoger la muestra de RT, se utilizó el mismo cerdo para el muestreo de HN. Se colocó un HN estéril en la nariz del cerdo y se arremolinó este en cada una de las fosas nasales durante aproximadamente tres segundos por fosa. A continuación, se colocó el hisopo en 3 ml de medio BHI. Cabe señalar que los cerdos seleccionados para las muestras individuales no se eligieron específicamente en función de ningún signo clínico indicativo de enfermedad; sino simplemente de acuerdo con el interés en trabajar con la trampa y, por lo tanto, ser atrapado con éxito de manera oportuna. También debe tenerse en cuenta que los cerdos no se identificaron individualmente y, por lo tanto, existe la posibilidad de que el mismo animal haya sido muestreado en diferentes eventos. Después de la recogida, todas las muestras se colocaron en una bandeja con hielo, se transportaron a >

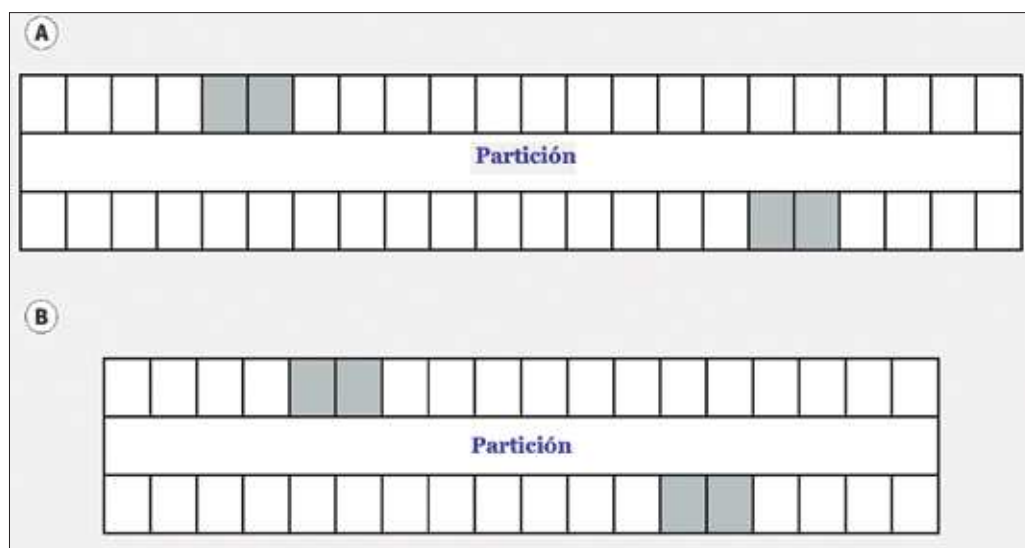


FIGURA 2 Diseño de establo para A) granja 1 y B) granja 2 analizado en este estudio. Cada granja tenía cuatro de los establos representados y cada cuadrado representa un corral, y el área sombreada indica el área de muestreo utilizada dentro de los establos.

► la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Estatal de Carolina del Norte en un plazo de tres horas y se guardaron en un refrigerador durante 1 a 3 días antes de enviarse a la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Estatal de Ohio. Las muestras de FO se centrifugaron a 1200 g durante 10 minutos (máquina centrífuga *Sorvall Legend RT*; Thermo Scientific) para eliminar cualquier residuo antes de la prueba de RT-PCR.

PRRSV RT-PCR

Las muestras se analizaron para detectar la presencia de PRRSV mediante RT-PCR utilizando protocolos estándar. La extracción de las muestras se realizó utilizando el kit de extracción de ARN *Omega Mag-Bind* (Omega Bio-tek Inc) con un procesador de partículas magnéticas *MagMAX Express 96* (Applied Biosystems) utilizando un procedimiento modificado en laboratorio con un programa precargado de la empresa (AM1836 DW 100 v219). Este procedimiento utilizó dos lavados con 400 μ L de tampón *VHB* (Omega Bio-tek Inc) y 500 μ L de tampón de lavado *SPR* (Omega Biotek Inc) para los lavados 1 y 2, respectivamente, con las siguientes condiciones de ciclo: la etapa 1 fue 1 ciclo de 48° C durante 10 minutos, la etapa 2 fue 1 ciclo de 95° C durante 10 minutos y la etapa 3 fue 40 ciclos de 95° C durante 15 segundos seguidos de 60° C durante 45 segundos. Los valores del umbral de ciclo (UC) se calcularon para cada muestra estableciendo el umbral en el 5% del control positivo en el ciclo 40. Las muestras con

un Ct de $\leq 37,0$ se consideraron positivas y las muestras con un Ct entre 37,1 y 40 se consideraron sospechosas según valores descritos por trabajos anteriores²⁰.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó utilizando *STATA 14.2* (StataCorp LP). Se utilizaron estadísticas descriptivas para describir la detección de muestras positivas para PRRSV a lo largo del tiempo para ambas granjas y para los diferentes métodos de muestreo. Todos los análisis se realizaron a nivel de muestra. Primero, se utilizó un test de Fisher para probar la asociación entre la detección de PRRSV en el raspado de amígdalas y el predictor de interés en granja. Además, para abordar la agrupación de muestras dentro de los eventos de muestreo y los posibles efectos de confusión, se construyó un modelo de regresión logística exacta multivariable utilizando un enfoque de regresión progresiva por pasos, con estimaciones medianas no sesgadas (MUE)²¹. Este modelo también intentó investigar la asociación entre la detección de PRRSV en RA y la granja, pero al tiempo que contabiliza el evento de muestreo (1-4) y el número total de muestras recolectadas. Antes de la adición al modelo final, se probó la correlación entre esas variables mediante la prueba de correlación de Spearman y un punto de corte de 0,8. Los factores de confusión se definieron como variables que cambiaron el coeficiente de nuestra principal variable de interés (granja) en un 20% o más una vez que se eliminaron del

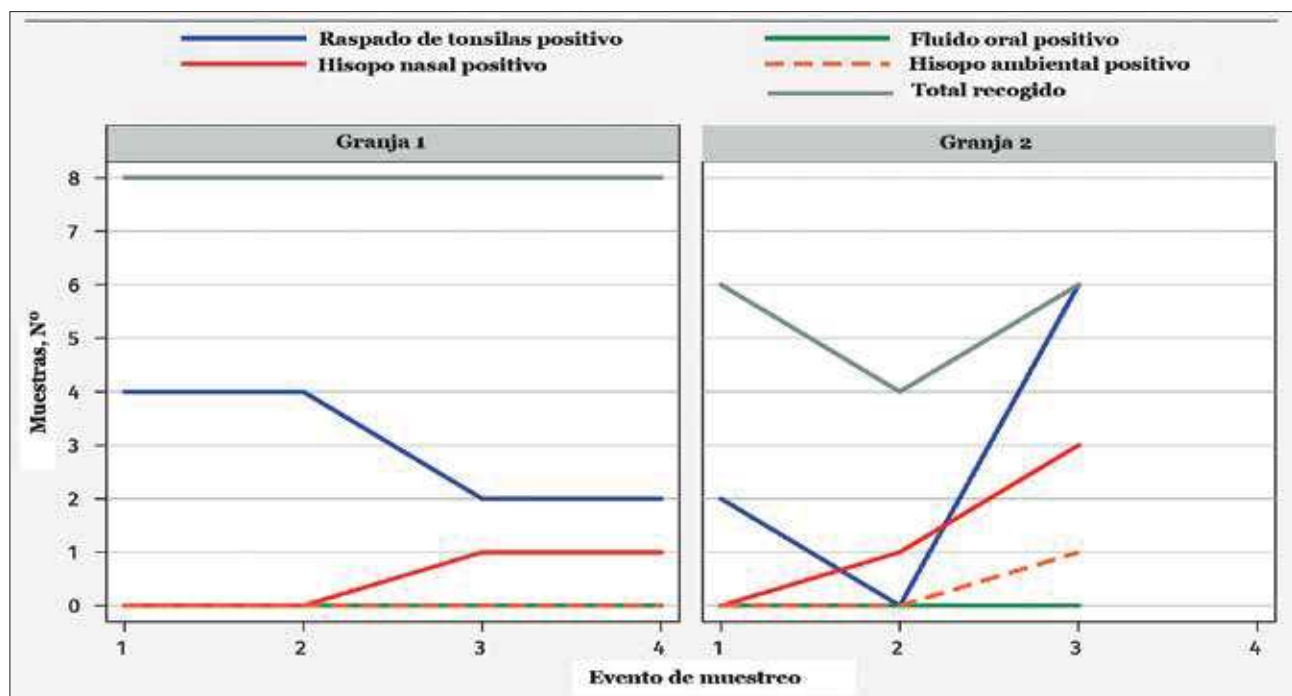


FIGURA 3 Número total de muestras positivas recogidas de PRRSV por RT-PCR para los 4 tipos de muestras diferentes (raspados de tonsilas, hisopos nasales, fluido oral e hisopo ambiental) durante los cuatro eventos de muestreo.

Table 1: Proporciones de muestras positivas de raspado de tonsilas con PCR PRRSv para los diferentes tipos de muestras evaluados en el estudio

Evento muestral	Raspado de tonsilas, N° (%)		Fluido Oral, N° (%)		Hisopo Nasal, N° (%)		Hisopo Ambiental, N° (%)	
	Positiva	Sospecha	Positiva	Sospecha	Positiva	Sospecha	Positiva	Sospecha
Granja 1 [†]	1 (n = 8)	4 (50.0)	1 (12.5)	0 (0)	1 (12.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	2 (n = 8)	4 (50.0)	2 (25.0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	3 (n = 8)	2 (25.0)	2 (25.0)	0 (0)	1 (12.5)	1 (12.5)	0 (0)	0 (0)
	4 (n = 8)	2 (25.0)	1 (12.5)	0 (0)	0 (0)	1 (12.5)	0 (0)	0 (0)
	Total (n = 32)	12 (37.5)	6 (18.75)	0 (0)	2 (6.3)	2 (6.3)	0 (0)	0 (0)
Granja 2 [‡]	1 (n = 6)	2 (33.3)	3 (50.0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	2 (n = 4)	0 (0)	1 (25)	0 (0)	0 (0)	1 (25)	0 (0)	0 (0)
	3 [§] (n = 6)	6 (100.0)	0 (0)	0 (0)	2 (33.3)	3 (50.0)	1 (16.7)	1 (16.7)
	Total (n = 16)	8 (50.0)	4 (25.0)	0 (0)	2 (12.5)	4 (25.0)	1 (6.3)	1 (6.3)

* Sampling took place from May to August 2019.
† Suspect positive samples with a Ct value between 37.1 and 40.
‡ Farm 2 received the PRRSV vaccine and farm 1 did not.
§ New group of pigs.
RT-PCR = reverse transcriptase-polymerase chain reaction; PRRSV = porcine reproductive and respiratory syndrome virus; Ct = cycle threshold.

TABLA 1 Proporciones de muestras positivas para PRRSv por RT-PCR para los diferentes tipos de muestras evaluadas en este estudio.

modelo y, en tal caso, se retuvieron en el modelo final independientemente de la significancia estadística. La significación estadística se declaró en $P < .05$, y una tendencia estadística se declaró como $.05 \leq P < .10$

RESULTADOS

Se recolectaron un total de 192 muestras durante el período de estudio: 48 RT, 48 FO, 48 HN y 48 HA. La granja 1, la granja no vacunada, tuvo 12 raspados positivos para RT-PCR para PRRSv (4 muestras positivas ocurrieron en cada uno de los eventos del primer y segundo muestreo, y 2 muestras positivas en cada uno de los eventos de muestreo tercero y cuarto) y 2 muestras positivas para RT-PCR de PRRSv HN (una muestra positiva en cada uno de los eventos de los muestreos tercero y cuarto; *Figura 3* y *Tabla 1*). Los dos animales que dieron positivo por HN también fueron

positivos por RT. La granja 2, la granja vacunada, tuvo 8 raspados positivos para PRRSv RT-PCR (2 muestras positivas en el primer evento de muestreo y 6 muestras positivas en el tercer muestreo), 4 HN positivas para PRRSv RT-PCR (1 muestra positiva en el segundo muestreo y 3 muestras positivas en el tercer muestreo) y 1 HA positivo para RT-PCR de PRRSv (que ocurre en el tercer evento de muestreo; *Figura 3* y *Tabla 1*).

De los cuatro animales que dieron positivo por HN, 3 también dieron positivo por RT. Si bien una pequeña proporción de HN e HA dieron positivo en RT-PCR (12,5% [6 de 48] y 2,1% [1 de 48], respectivamente), estos métodos de muestreo no arrojaron resultados positivos consistentes durante todo el período de estudio. En general, hubo 20 RT, cero FO, 6 HN y 1 prueba RT-PCR positiva para PRRSv a lo largo de este estudio, y el

Evento muestral	Raspado de tonsila		Fluido Oral		Hisopo Nasal		Hisopo Ambiental	
	Ct, media (rango)	n	Ct, media (rango)	n	Ct, media (rango)	n	Ct, media (rango)	n
1	37.1 (35.9-38.8)	10	37.6	1	-	0	-	0
2	35.9 (31.6-38.3)	7	-	0	35.4	1	-	0
3	32.7 (27.6-38.3)	10	37.6 (37.1-37.9)	3	36.4 (34.2-38.2)	5	36.95 (36.8-37.1)	2
4	35.4 (33.2-37.7)	3	-	0	36.7	1	-	0
Total	35.2 (27.6-38.8)	30	37.6 (37.1-37.9)	4	35.97 (34.2-38.2)	7	36.95 (36.8-37.1)	2

Ct = cycle threshold; RT-PCR = reverse transcriptase-polymerase chain reaction; PRRSV = porcine reproductive and respiratory syndrome virus.

TABLA 2 Media (rango) de valores de muestras de raspado de tonsilas, líquido oral, hisopado nasal e hisopado ambiental de ambas granjas con RT-PCR positivo y sospechoso positivo para PRRSv.

Evento muestral	Granja 1. Corral (no vacunados)								Granja 2. Corral (vacunados)							
	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8
1	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	NA	NA
2	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	NA	NA	NA	NA
3	-	+	-	-	-	-	+	-	NA	NA	+	+	+	+	+	+
4	-	-	-	-	+	-	+	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

PRRSV = porcine reproductive and respiratory syndrome virus; RT-PCR = reverse transcriptase-polymerase chain reaction; NA = no samples were collected for that sampling event due to pig flow from the finisher farm to slaughter.

TABLA 3 Representación de muestras de raspado de tonsilas positivas para RT-PCR PRRSv (representadas por +) para cada corral.

48,1% (13 de 27) de las muestras positivas se produjeron en el último evento de muestreo (*Tabla 1*). Hubo varias muestras en cada categoría de muestreo que arrojaron un resultado sospechoso de PRRSv por RT-PCR.

Los valores del UC para las muestras positivas y sospechosas positivas se han resumido en la *Tabla 2*, destacando la media y el rango para cada categoría de muestreo y evento.

Se recogió un número reducido de muestras de la granja 2 debido a los procedimientos operativos en la instalación. Durante el segundo mes de muestreo, los cerdos de la granja 2 habían alcanzado el peso de mercado y fueron retirados de la instalación. Se trajo a la instalación a un nuevo grupo de cerdos de la misma granja de cerdas de origen para el último evento de muestreo (muestreo 3). Por lo tanto, no hubo muestras recogidas en la granja 2 para el cuarto muestreo y todas las muestras recogidas durante el tercer muestreo fueron de un nuevo grupo de cerdos.

Durante el período de estudio de 4 meses, 13 de las 16 áreas analizadas (considerando ambas granjas) dieron positivo a PRRSv RT-PCR al menos una vez con muestreo de RT (*Tabla 3*). Todos los corrales de la granja 2 que fueron analizados durante el tercer evento (del corral 3 al corral 8) dieron positivo en PRRSv RT-PCR usando raspado de tonsilas (*Tabla 3*).

DISCUSIÓN

Las muestras de raspado de amígdalas arrojaron resultados de RT-PCR de PRRSv más positivos a lo largo del tiempo durante períodos de tiempo más prolongados en comparación con el método de muestreo de uso común actual, la prueba FO. Hasta la fecha, los métodos de RT para la detección de PRRSv a través de RT-PCR no se han explorado en condiciones de campo para las pruebas de diagnóstico de PRRSv para determinar el estado de PRRS a nivel de rebaño.

Este estudio describió diferentes métodos de muestreo para detectar PRRSv en poblaciones de cerdos en crecimiento en condiciones de campo para granjas que

utilizan diferentes estrategias de manejo de PRRS. Hubo una diferencia en la detección de PRRSv entre los 4 métodos de muestreo: RT, FO, HN e HA. Nuestros hallazgos corroboran una investigación similar que mostró una eventual disminución del PRRSv presente en los tejidos linfoides después de 3 a 4 meses después de la exposición^{4,13,16}; no obstante, pudimos detectar PRRSv con RA hasta 168 días después de la exposición al PRRSv.

El raspado de amígdalas fue el único método de muestreo que obtuvo muestras positivas de manera constante durante los cuatro eventos de muestreo, a pesar de haber sido probado a nivel individual en las condiciones de este estudio. Aunque el RT utilizó solo un cerdo por corral para determinar el estado de la piara, planteamos la hipótesis de que la persistencia del virus en los tejidos linfoides podría explicar la mayor prevalencia en comparación con el FO, que prueba un mayor número de cerdos simultáneamente. Además, considerando que la sensibilidad de las pruebas de FO disminuye con el tiempo²², el raspado demostró ser un método de muestreo prometedor para la detección a largo plazo del PRRSv. La determinación de un método de diagnóstico preciso para detectar PRRSv en cerdos de engorde, especialmente en escenarios de baja prevalencia de PRRSv, es vital para declarar la ausencia de enfermedad, ya que pueden surgir graves consecuencias por la introducción inadvertida de PRRSv en poblaciones negativas. Nuestros resultados complementan los de Horter et al²³, quienes informaron que el RT de RRT-PCR fue la combinación de ensayo-muestra más eficaz para detectar PRRSv en animales infectados de manera persistente²³. La etapa de la infección y la naturaleza de la enfermedad está bien descrita por Henao-Díaz et al²⁴, quienes sugieren que es vital para la relación entre los diversos estados de transición de la enfermedad del PRRSv y la capacidad de detectar la infección basándose en esos estados, especialmente en casos de infecciones persistentes.

Otra limitación de nuestro estudio fue que el diseño del estudio no permitió cálculos de sensibilidad o especificidad para el muestreo de RT, ya que las muestras

no se recogieron del mismo animal para la comparación directa. Sin embargo, el objetivo de este trabajo fue describir el uso y las limitaciones del RT, FO, HN e HA para detectar PRRSv; y no validar RT como estándar de oro en comparación con otros métodos. Además, este estudio se realizó de mayo a agosto, por lo tanto no sabemos si estos resultados diferirían durante los meses más fríos. Sin embargo, no anticiparíamos grandes desviaciones en nuestras conclusiones considerando que se ha demostrado que el PRRSv sobrevive e infecta a los animales durante todo el año²⁷ y que las granjas porcinas modernas comúnmente pueden proporcionar un clima bien controlado dentro de las instalaciones durante todo el año. Por último, en las condiciones de este estudio, no pudimos obtener un marco de lectura abierto (ORF) de 5 secuencias de las muestras que habíamos recogido para diferenciar si el PRRSv detectado mediante PCR correspondía a virus vacunales o de tipo salvaje. Esta información habría sido importante para diferenciar entre la posible introducción lateral de PRRSv y la vacuna o cepas de brotes anteriores.

REFERENCIAS

- Holtkamp DJ, Kliebenstein JB, Neumann EJ, Zimmerman JJ, Rotto HF, Yoder TK, Wang C, Yeske PE, Mowrer CL, Haley CA. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on United States pork producers. *J Swine Health Prod.* 2013;21(2):72-84.
- Pérez AM, Davies PR, Goodell CK, Holtkamp DJ, Mondaca-Fernández E, Poljak Z, Tousignant SJ, Valdés-Donoso P, Zimmerman JJ, Morrison RB. Lessons learned and knowledge gaps about the epidemiology and control of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in North America. *J Am Vet Med Assoc.* 2015;246(12):1304-1317. doi:10.2460/javma.246.12.1304.
- Zimmerman JJ, Dee SA, Holtkamp DJ, Murtaugh MP, Stadejek T, Stevenson GW, Torremorell M, Yang H, Zhang J. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (Porcine Arteriviruses). In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, Zhang J, eds. *Diseases of Swine.* 11th ed. Ames, IA: Wiley-Blackwell; 2019:665-708.
- Wills RW, Zimmerman JJ, Yoon KJ, Swenson SL, Hoffman LJ, McGinley MJ, Hill HT, Platt KB. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: routes of excretion. *Vet Microbiol.* 1997;57(1):69-81.
- 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(1):108. doi:10.1186/s13567-016-0391-4.
- Holtkamp DJ, Polson DD, Torremorell M, Morrison B, Classen DM, Becton L, Henry S, Rodibaugh MT, Rowland RR, Snelson H, Straw B, Yeske P, Zimmerman JJ. Terminology for classifying swine herds by porcine reproductive and respiratory syndrome virus status. *J Swine Health Prod.* 2011;19(1):44-56.
- Swine Health Information Center. *Swine Disease Reporting System Report 25.* <https://www.swinehealth.org/wp-content/uploads/2020/03/SHIC-109-DSDMR-3-4-2020.pdf>. Published March 2020. Accessed May 3, 2020.
- Kittawornrat A, Prickett J, Chittick W, Wang C, Engle M, Johnson J, Patnayak D, Schwartz T, Whitney D, Olsen C, Schwartz K, Zimmerman JJ. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in serum and oral fluid samples from individual boars: will oral fluid replace serum for PRRSV surveillance? *Virus Res.* 2010;154(1-2):170-176. doi:10.1016/j.virusres.2010.07.025
- Duan X, Nauwynck HJ, Pensaert MB. Virus quantification and identification of cellular targets in the lungs and lymphoid tissues of pigs at different time intervals after inoculation with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet Microbiol.* 1997;56:9-19.
- Rossow KD, Bautista EM, Goyal SM, Molitor TW, Murtaugh MP, Morrison RB, Benfield DA, Collins



- JE. Experimental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in one-, four-, and 10-week-old pigs. *J Vet Diagn Invest.* 1994;6:312.
11. Charpin C, Mahé S, Keranflec'h A, Belloc C, Cariolet R, Le Potier M-F, Rose N. Infectiousness of pigs infected by the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is time-dependent. *Vet Res.* 2012;43(1):69. doi:10.1186/1297-9716-43-69.
 12. Vilalta C, Sanhueza J, Garrido J, Murray D, Morrison R, Corzo CA, Torremorell M. Indirect assessment of porcine reproductive and respiratory syndrome virus status in pigs prior to weaning by sampling sows and the environment. *Vet Microbiol.* 2019;237:108406. doi:10.1016/j.vetmic.2019.108406.
 13. Wills RW, Doster AR, Galeota JA, Sur J-H, Osorio FA. Duration of infection and proportion of pigs persistently infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Clin Microbiol.* 2003;41(1):58-62. doi:10.1128/JCM.41.1.58-62.2003.
 14. Hess AS, Lunney JK, Abrams S, Choi I, Tribble BR, Hess MK, Rowland RR, Plastow GS, Dekkers JC. Identification of factors associated with virus level in tonsils of pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Anim Sci.* 2019;97(2):536-47.
 15. United States Department of Agriculture Animal and Plant Health Inspection Service. Procedure Manual for Classical Swine Fever (CSF) Surveillance. https://www.aphis.usda.gov/vs/nahss/swine/csf/CSF_procedure_manual_2007.pdf. Published April 1, 2007. Accessed May 3, 2020.
 16. Allende R, Laegreid WW, Kutish GF, Galeota JA, Wills RW, Osorio FA. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: description of persistence in individual pigs upon experimental infection. *J Virol.* 2000;74(22):10834-7. doi:10.1128/JVI.74.22.10834-10837.2000.
 17. Rotolo ML, Sun Y, Wang C, Giménez-Lirola L, Baum DH, Gauger PC, Harmon KM, Hoogland M, Main R, Zimmerman JJ. Sampling guidelines for oral fluid-based surveys of group-housed animals. *Vet Microbiol.* 2017;209:20-9. doi:10.1016/j.vetmic.2017.02004.
 18. White D, Rotolo M, Olsen C, Wang C, Prickett J, Kittawornrat A, Panyasing Y, Main RG, Rademacher C, Hoogland M, Zimmerman JJ. Recommendations for pen-based oral-fluid collection in growing pigs. *J Swine Health Prod.* 2014;22(3):138-41.
 19. Bliss N, Nelson SW, Nolting JM, Bowman AS. Prevalence of influenza A virus in exhibition swine during arrival at agricultural fairs. *Zoonoses Public Health.* 2016;63(6):477-85. doi:10.1111/zph.12252
 20. Gerber PF, O'Neill K, Owolodun O, Wang C, Harmon K, Zhang J, Halbur PG, Zhou L, Meng X-J, Opriessnig T. Comparison of commercial real-time reverse transcription-PCR assays for reliable, early, and rapid detection of heterologous strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in experimentally infected or noninfected boars by use of different sample types. *J Clin Microbiol.* 2013;51(2):547-56. doi:10.1128/JCM.02685-12
 21. Hirji KF, Tsiatis AA, Mehta CR. Median unbiased estimation for binary data. *Am Stat.* 1989;43(1):7-11.
 22. Prickett J, Simer R, Christopher Hennings J, Yoon K-J, Evans RB, Zimmerman JJ. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in porcine oral fluid samples: a longitudinal study under experimental conditions. *J Vet Diagn Invest.* 2008;20(2):156-63. doi:10.1177/104063870802000203
 23. Horter DC, Pogranichniy RM, Chang C-C, Evans RB, Yoon K-J, Zimmerman JJ. Characterization of the carrier state in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Vet Microbiol.* 2002;86(3):213-28. doi:10.1016/S0378-1135(02)00013-5.
 24. Henao-Diaz A, Ji J, Giménez-Lirola L, Baum DH, Zimmerman J. Understanding and interpreting PRRSV diagnostics in the context of "disease transition stages". *Res Vet Sci.* 2020;131:73-176. doi:10.1016/j.rvsc.2020.04.023.
 25. Madapong A, Temeeyasen G, Saengchuto K, Tripipat T, Navasakuljinda W, Boonsoongnern A, Tantituvanont A, Nilubol D. Humoral immune responses and viral shedding following vaccination with modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines. *Arch Virol.* 2017;162(1):139-46. doi:10.1007/s00705-016-3084-4.
 26. Linhares DC, Cano JP, Wetzell T, Nerem J, Torremorell M, Dee SA. Effect of modified-live porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSv) vaccine on the shedding of wild-type virus from an infected population of growing pigs. *Vaccine.* 2012;30(2):407-13. doi:10.1016/j.vaccine.2011.10.075
 27. Zimmerman JJ, Jacobs AC, Hermann JR, Muñoz-Zanzi C, Prickett JR, Roof MB, Yoon K-J. Stability of porcine reproductive and respiratory syndrome virus at ambient temperatures. *J Vet Diagn Invest.* 2010;22(2):257-60. doi:10.1177/104063871002200216.

El artículo original puede leerse en el QR adjunto:

<https://www.aasv.org/shap/issues/v29n2/v29n2p72.pdf>

