

UNIVERSIDAD NACIONAL
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO
POSGRADO REGIONAL EN CIENCIAS VETERINARIAS
TROPICALES



Prevalencia y caracterización molecular del Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRSV) en cerdos de producción de Costa Rica.

Mónica Guzmán Saborío

Universidad Nacional, Heredia, Febrero 2020

Tesis sometida a consideración del Tribunal Examinador del Posgrado Regional en Ciencias Veterinarias Tropicales, Maestría en Enfermedades Tropicales para optar por el grado de *Magister Scientiae*

Prevalencia y caracterización molecular del Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRSV) en cerdos de producción de Costa Rica.

Mónica Guzmán Saborío

Tesis sometida a consideración del Tribunal Examinador del Posgrado Regional en Ciencias Veterinarias Tropicales, Maestría en Enfermedades Tropicales para optar por el grado de *Magister Scientiae*

MIEMBROS DEL TRIBUNAL EXAMINADOR

Dr. Luis A. Miranda Calderón

Representante del Consejo Central de Posgrado

DMV Gaby Dolz Wiedner PhD

Coordinador del posgrado o su representante

DMV MSc. Bernal León Rodríguez

Tutor de tesis

MSc. Juan Miguel Cordero Solórzano

Miembro del Comité Asesor

DMV. Juan José Romero Zúñiga PhD

Miembro del Comité Asesor

DMV. Carlos Jiménez Sánchez PhD

Miembro del Comité Asesor

Mónica Guzmán Saborío

Sustentante

DEDICATORIA

A mi familia, en especial a mi madre y mi hija, quienes siempre han sido mi fuente de amor e inspiración para alcanzar cada una de las metas que me propongo. Gracias por creer en mí y por brindarme tanto apoyo y fortaleza.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme la salud, la oportunidad y la perseverancia para alcanzar esta meta.

A mi mamá, por ser siempre mi fuente de inspiración, por su apoyo incondicional, su paciencia y sus consejos en todo momento; y a mi hijita, por estar en todo momento a mi lado, por ayudarme, acompañarme y sostenerme tantas veces que lo necesité. A mi familia, mi papá, mis hermanos y mis sobrinas, gracias por inspirarme y apoyarme tanto siempre.

A mi amigo, compañero y hermano Fabián, por su paciencia y ayuda siempre que lo necesité. Al igual que todos mis compañeros del Laboratorio de Bioseguridad del SENASA, por todo su apoyo y comprensión.

A mis tutores MSc. Bernal León y MSc. Juan Miguel Cordero, no tengo palabras para agradecerles tanto apoyo y ayuda, desde el primer momento hasta el día de hoy. Mi agradecimiento eterno por todo y por tanto.

A mis lectores, Dr. Juan José Romero y Dr. Carlos Jiménez, por todas sus enseñanzas y colaboración durante este proceso.

A la Dra. Gaby Dolz y a la Dra. Lisbeth Ramírez, por su acompañamiento, paciencia y colaboración.

A los doctores Ronald Meléndez, Ronald Fallas, Emily Jiménez y Susana Ureña, por su colaboración en el muestreo requerido para esta investigación. Asimismo, a todas las granjas porcinas, que nos abrieron sus puertas para realizar este proyecto.

Al Posgrado Regional en Ciencias Veterinarias Tropicales (PCVET), al SENASA, y a la empresa Böehringer Ingelheim Vetmedica, en especial al Dr. Alberto Uribe, por su acompañamiento, apoyo y colaboración brindados durante este proceso de investigación.

ÍNDICE GENERAL

	Página
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Índice general.....	vi
Índice de cuadros.....	vii
Índice de figuras.....	viii
Resumen general.....	ix
Introducción general.....	xi
Referencias bibliográficas.....	xxiv

Artículo 1.

Resumen	1
1. Introducción.....	2
2. Materiales y métodos.....	5
2.1. Diseño de estudio	5
2.1.1. Muestreo y análisis de resultado.....	5
2.1.2. Sujetos de estudio.....	7
2.1.3. Criterios de inclusión.....	7
2.2. Análisis molecular.....	7
3. Resultados.....	8
4. Discusión	10
5. Conclusiones	15
6. Recomendaciones.....	16
7. Referencias bibliográficas.....	17

Artículo 2.	Página
Resumen	22
1. Introducción.....	23
2. Materiales y métodos.....	26
3. Resultados.....	29
4. Discusión	32
5. Conclusiones	33
6. Recomendaciones	34
7. Referencias bibliográficas.....	35
Discusión general	39
Conclusiones generales	45
Recomendaciones generales	46
Anexo 1. Hoja de campo	48
Anexo 2. Consentimiento informado	49

ÍNDICE DE CUADROS

Artículo 1.

Tabla 1. Prevalencia de PRRSV en granjas de producción de Costa Rica	9
--	---

Artículo 2.

Cuadro 1. Cebadores PRRS OUT a utilizar para la amplificación de secuenciación	27
Cuadro 2. Cebadores PRRS IN a utilizar para la amplificación de secuenciación	27

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Impacto económico del PRRS en la industria porcina	xii
Figura 2. Estructura del virus de PRRS.....	xiii
Figura 3. Organización del genoma del PRRSV	xv
Figura 4. Distribución geográfica del virus de PRRS en el año 2016.....	xvii
Figura 5. Signos clínicos observados en cerdos virémicos	xx

Artículo 1.

Figura 1. Mapa de distribución de granjas positivas y negativas a PRRSV.....	10
--	----

Artículo 2.

Figura 1. Árbol filogenético de PRRSV en granjas de producción de Costa Rica	31
--	----

RESUMEN GENERAL

El Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS) es una enfermedad viral que afecta a los cerdos y que está distribuida en todo el mundo, causando cuantiosas pérdidas económicas en el sector porcicultor. Este virus pertenece al orden Nidovirales, familia *Arteriviridae*, género *Porartevirus*. Se han descrito las especies PRRS1 y PRRS2, denominadas anteriormente genotipo europeo (EU) y americano (NA) respectivamente. El genoma viral contiene diez marcos de lectura abierta (ORF). En esta investigación se utilizó un kit comercial para el diagnóstico del virus y determinar la prevalencia, y para la caracterización molecular se utilizó el ORF 5, que codifica para la proteína estructural GP5, para estudiar la filogenia del PRRSV, ya que esta proteína es la más heterogénea, con 88%-99% de identidad de aminoácidos entre cepas de la misma especie, y 52%-55% de identidad entre especies. El objetivo de este estudio fue determinar la prevalencia del PRRSV y establecer cuáles son las especies y cepas que están circulando en cerdos de producción, en 25 granjas de Costa Rica.

Se muestrearon 1278 animales de diferentes edades, las muestras de suero fueron recolectadas en 256 grupos (pooles) de 5 animales y procesadas por RT-PCR. Se analizó la prevalencia de acuerdo al tamaño de la granja, a la edad de los animales y a la distribución geográfica. Posteriormente, se realizó secuenciación de Sanger de 18 muestras positivas, para analizar las relaciones filogenéticas y relacionar la distribución geográfica de algunas cepas presentes en Costa Rica.

La prevalencia general en 171 de 1278 animales fue de un 13,38%. De acuerdo al tamaño de la granja, los animales de granjas pequeñas presentaron mayor prevalencia, con un 37,97%. En cuanto a la edad de los animales, la prevalencia más alta (23,05%) se presentó en los cerdos de 12 semanas. La provincia de Cartago tuvo la prevalencia más alta (34,26%), mientras que en Guanacaste no se detectaron animales positivos. La totalidad de muestras positivas corresponden a PRRS 2 (NA). La prevalencia de la enfermedad es muy variable al considerar los grupos etarios y distribución geográfica analizada, lo cual es consistente con estudios previos tanto a nivel nacional como en otros países.

En el análisis filogenético se incluyeron 8 secuencias de 5 diferentes provincias del país: San José, Alajuela, Cartago, Heredia y Puntarenas. Las secuencias obtenidas se agruparon en tres diferentes “cluster”. Las muestras de San José, Alajuela y Puntarenas están más estrechamente emparentadas, ya que comparten ancestros comunes entre ellas, sin embargo, las muestras de Heredia y Cartago se ubican en grupos completamente separados, lo que sugiere que el virus presenta tres diferentes orígenes y épocas de ingreso al país. La muestra proveniente de Cartago es la más ancestral, ya que está estrechamente relacionada con el grupo externo utilizado para enraizar el árbol (PRRS 1). Por el contrario, las muestras de Heredia presentan una mayor distancia genética con respecto al grupo externo, y al resto de secuencias de Costa Rica por lo que pueden ser las más divergentes.

Palabras clave

Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino, PRRS, prevalencia, caracterización molecular, ORF5, Costa Rica.

INTRODUCCIÓN GENERAL

El Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS) es una enfermedad producida por un virus que lleva el mismo nombre (PRRSV). Los hospedadores naturales del virus del PRRS son el jabalí y el cerdo doméstico. No obstante, no hay muchos estudios sobre la presentación clínica de la enfermedad en el jabalí, o sobre su potencial papel en la transmisión del PRRSV a cerdos domésticos. Este virus se caracteriza por su alta variabilidad genética y antigénica, sus propiedades inmunomoduladoras, viremia prolongada, infecciones persistentes, y la replicación en macrófagos, que son consideradas las células diana del PRRSV (Cho y Dee, 2006; García *et al.*, 2007).

El PRRSV causa una alta mortalidad pre-destete en lechones infectados en el útero, además inmunosupresión y el consiguiente aumento en la susceptibilidad a otras enfermedades infecciosas, particularmente las enfermedades respiratorias en cerdos infectados después del destete. Durante un brote, la mortalidad en los primeros 10 días de vida puede ser tan alta como 80%. Los cerdos de engorde infectados temporalmente comen menos y tienen más problemas respiratorios (Terpstra *et al.*, 1991; Evans *et al.*, 2008).

Por esta razón, el PRRS ha sido considerado como uno de los problemas más importantes del sector porcino mundial, ya que causa graves pérdidas económicas, aunque es importante destacar que no afecta a las personas ni altera la calidad de la carne. Tal y como se muestra en la Figura 1, en la industria porcina de los EE.UU. se han estimado pérdidas de hasta 664 millones de dólares anuales, por el perjuicio en la sanidad de los animales y los costos necesarios para su control. En el caso de Europa, existen algunos estudios concentrados en

los principales países productores, como España y Alemania; y se estima que en este continente la enfermedad genera un impacto económico que está entre 1000-1500 millones de euros anuales (Holtkamp *et al.*, 2013; Cubillos, 2016).



Figura 1. Impacto económico del PRRS en la industria porcina. Tomado de www.prrscontrol.com

Etiología

La enfermedad es causada por un virus esférico, con una envoltura lipídica de aproximadamente 50-65 nm de diámetro. Su nucleocápside presenta simetría helicoidal (Figura 2), donde se encuentra el genoma constituido por ácido ribonucleico (ARN) monocatenario (13-15 kb), de polaridad positiva (Mendoza, 2015; Rossow, 1998).

Al ser un virus envuelto, su supervivencia fuera del huésped puede verse afectada fácilmente, si es calentado a 56°C por 45 minutos, además que puede reducir su infectividad

hasta en un 90% con un pH inferior de 5 y superior a 7. Asimismo, es sensible a la deshidratación, desinfectantes comunes y solventes de lípidos, como cloroformo y éter (Cho y Dee, 2006; OIE, 2015).

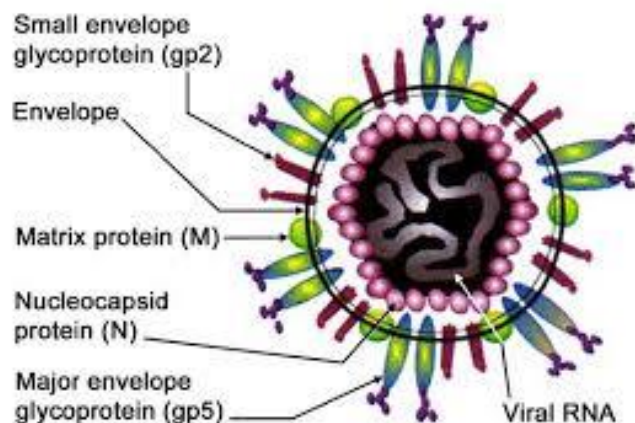


Figura 2. Estructura del virus de PRRS. Tomado de (Fariñas, 2012)

Este virus ha sido reclasificado recientemente en el género *Porartevirus* (antes *Arterivirus*), familia *Arteriviridae* y el orden Nidovirales. Anteriormente se describieron dos genotipos del virus: el tipo 1 o genotipo europeo (EU o Lelystad), que fue aislado por Wensvoort *et al.* (1991), en Europa; y el tipo 2 o genotipo americano (NA o VR2332), aislado por Collins *et al.* (1992), en los Estados Unidos de América. Sin embargo, en el 2017 se ratificó una nueva clasificación dentro la familia *Arteriviridae*, con la creación del género *Porartevirus*, en la cual los dos genotipos del PRRSV, se han constituido en dos nuevas especies (PRRS 1 y PRRS 2), de las 4 propuestas dentro de este nuevo género (Adams *et al.*, 2017).

Organización del genoma

El genoma viral contiene diez marcos de lectura abierta (ORF por sus siglas en inglés), que se transcriben en las células como un conjunto anidado de ARNm subgenómicos. El ORF 1a y ORF 1b que están situados en el extremo 5' del genoma, representan casi el 75% del genoma viral y codifican para 2 poliproteínas que son cortadas por proteasas, produciendo al menos 12 proteínas no estructurales, entre las que se encuentran helicasas, inhibidores de interferón (INF), proteínas regulatorias, y la ARN polimerasa dependiente de ARN, entre otras. Las principales proteínas estructurales consisten en una glicoproteína de envoltura de 25 kDa (GP5), una proteína de 18-19 kDa de membrana no glicosilada (M), y una proteína de 15 kDa de la nucleocápside (N), las cuales son codificadas por los ORF 5, 6 y 7, respectivamente. (Figura 3). (Suárez, 1995; Kukielka y Sánchez-Vizcaíno, 2008; Music y Gagnon, 2010; Kvisgaard *et al.*, 2013).

La proteína de la nucleocápside (N), es la más abundante y conservada del virión, y es altamente antigénica, lo que permite que sea adecuada para la detección de anticuerpos específicos del virus y otras técnicas de diagnóstico de la enfermedad. Además, se ha identificado un sitio antigénico conformacional común para las especies PRRS1 y PPRS2, que se localiza en la región central de esta proteína, permitiendo una detección más amplia de variantes (Music y Gagnon, 2010).

La GP5 es una proteína transmembranal glicosilada, y es la más heterogénea, con 88%-99% de identidad de aminoácidos entre cepas de la misma especie, y 52%-55% de identidad entre especies (PRRS1 y PPRS2). La GP5 y la proteína M forman un heterodímero con uniones de puentes disulfuro, que podría estar involucrado en la unión al receptor celular.

La proteína M contiene el epítipo inmunodominante, mientras que la GP5 contiene el epítipo neutralizante más importante. Los cerdos infectados con PRRSV primero desarrollan anticuerpos no neutralizantes contra el epítipo A y tiempo después (aproximadamente cuatro semanas) aparecen los anticuerpos neutralizantes contra el epítipo B. Por lo tanto, el epítipo A funciona como señuelo del virus, distrayendo de manera momentánea la respuesta neutralizante (Murtaugh *et al.*, 1995; Ostrowski *et al.*, 2002; Plagemann, 2004; Flores-Mendoza y Hernández, 2010). Los epítipos A y B están en la Gp5, A es inmunodominante pero no conlleva a la producción de anticuerpos neutralizantes, lo que si hace B. Además, A enmascara a B. La glicosilación de GP5 también regula la exposición del epítipo B.

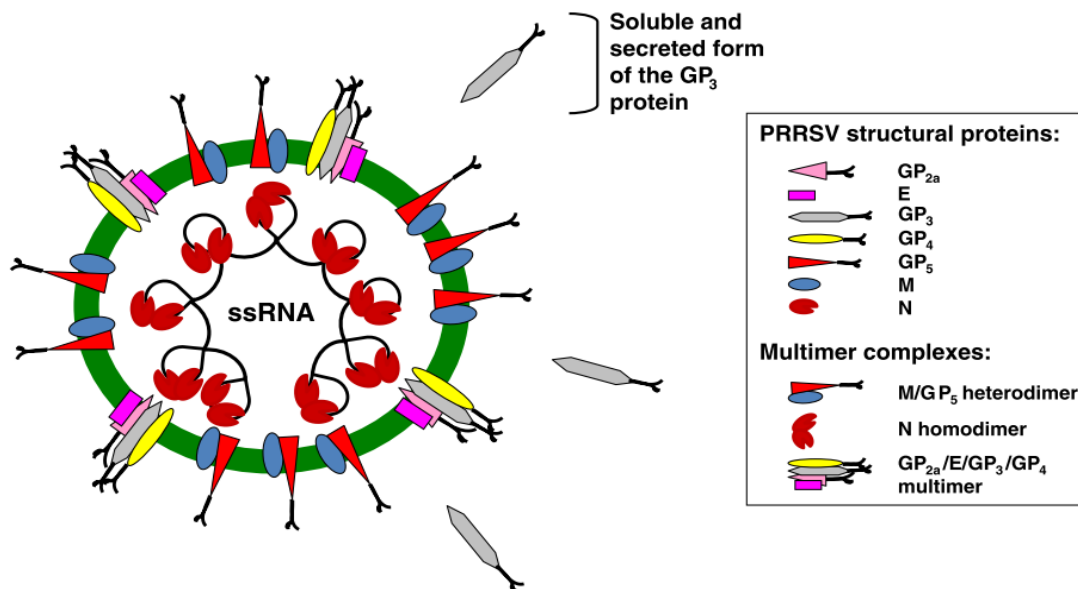


Figura 3. Organización del genoma del PRRSV. Se muestran las ubicaciones de las proteínas estructurales: GP2a, E, GP3, GP4, GP5, M y N, codificadas por los ORF 2-7 (Music y Gagnon, 2010).

Epidemiología y distribución del virus

Este virus fue reportado por primera vez en 1987 en los Estados Unidos de América y Canadá, como una enfermedad de etiología desconocida que llamaron Enfermedad Misteriosa del Cerdo, y posteriormente se reportaron los primeros casos en Europa, en 1990. Después de una fase epidémica grave, la enfermedad se convirtió en endémica y actualmente se encuentra distribuida por todo el mundo, en casi todos los países productores de cerdo (Terpstra *et al.*, 1991; Wensvoort *et al.*, 1991).

En Europa, los países que están libres de PRRSV incluyen Suiza, Suecia, Islandia, Noruega y Finlandia. Según los últimos datos encontrados en América, Argentina y Brasil no se reportan casos de PRRS, al igual que Australia y Nueva Zelanda. En regiones infectadas con alta densidad de piaras, en general el 60 %-80 % de los grupos suele estar infectado. La mayoría de los países europeos solo tiene cepas de PRRS 1, pero en algunos como Dinamarca, Alemania, Hungría o Polonia se han aislado cepas de ambas especies. Por su parte, el PRRS 2 es el más prevalente en América y Asia (Nodelijk, 2002; Ramírez, 2017).

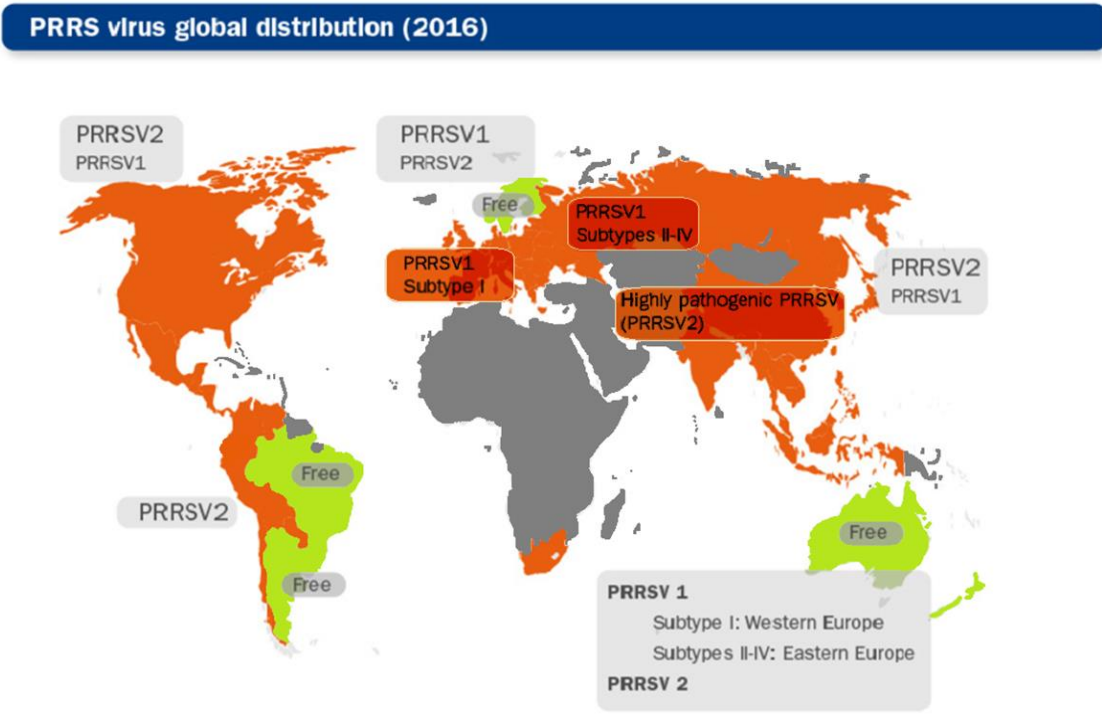


Figura 4. Distribución geográfica del virus de PRRS en el año 2016. Tomado de (Ramírez, 2017)

Estudios de seroprevalencia realizados en Costa Rica realizados por: Bermúdez (1996), Pineda-Sáenz (2001) y Castro-Mena (2006), han reportado la presencia del virus en zonas específicas, sin embargo, no existen datos a nivel nacional. En la mayoría de los países mencionados anteriormente, el virus actúa como una epidemia y como una enfermedad endémica a la vez, ya que, por un lado puede propagarse como una epidemia en poblaciones ingenuas, y por otro lado, permanece indefinidamente en una población afectada causando expresión clínica variable de una granja a otra (Blaha *et al.*, 2000).

Dada la peculiar respuesta inmune y variabilidad genética del virus, en una granja endémica se observan diferentes grupos de animales en cambio constante: 1- animales no infectados, 2- animales en proceso de infección y excreción vírica, 3- animales recuperados

de infección y que están protegidos, 4- animales recuperados de infección que pierden la protección y que vuelven a ser susceptibles, 5- animales portadores. Estos grupos son dinámicos, es decir los animales pasan de unos grupos a otros, lo que mantiene la infección en la granja (Callén, 2004). Es posible que 4 se deba a infecciones con variantes que escapan de la inmunidad colectiva.

Los registros epidemiológicos han ayudado a dilucidar la transmisión del PRRSV en los cerdos, ya que se ha detectado en sangre, fluidos orales, aerosoles, secreciones de glándulas mamarias, secreciones nasales y semen (Cho y Dee, 2006).

Transmisión

Los cerdos pueden infectarse por contacto directo o indirectamente. La exposición directa al PRRSV se produce por las vías respiratorias y oral, mucosas o por vía percutánea. Se puede dar transmisión aérea (ya sea a corta o larga distancia), por coito o inseminación, por ingestión, por contacto y por inoculación (Pileri y Mateu, 2018).

También se ha reportado transmisión vertical durante la gestación tardía, y horizontal después de contacto directo entre animales infectados y animales salvajes, así como la transmisión a través de semen de verracos infectados. Además de estas rutas directas, también se ha reportado propagación de la enfermedad en forma indirecta, por otros medios, como: fómites, agujas, mosquitos, moscas domésticas, vehículos de transporte (Yaeger *et al.*, 1993; Pileri y Mateu, 2018).

Sintomatología

Se observan algunos signos clínicos típicos en la fase inicial de la enfermedad, tales como: inapetencia, letargo y depresión. Esta fase inicial puede comenzar en la cría/gestación, en el parto, o en el área de crecimiento/finalización. En muchos de los casos, el virus se propaga rápidamente a otras áreas de producción (Christianson y Joo, 1994).

El síndrome además se identifica por un fallo en la reproducción de las cerdas, con signos como: infertilidad, agalactia, reducción en la tasa de partos, neumonía en cerdos en crecimiento y aumento de la mortalidad de lechones durante la lactancia. Los problemas principales se presentan cuando la infección aparece en el último tercio del período de gestación, ya que se presentan abortos con fetos momificados y nacimientos de lechones muertos o tan débiles que mueren al nacer. Se pueden observar otros signos reproductivos como: anorexia, fiebre, letargia, edema en miembros posteriores, cianosis en orejas y vulva, camadas pequeñas y reabsorción fetal (Figura 4). Los signos respiratorios también pueden estar presentes y las cerdas pueden transmitir el PRRSV vía transplacentaria a los lechones. En lechones que superan la preñez y las fases neonatales, el PRRS se manifiesta como una enfermedad respiratoria y se acompaña de infecciones secundarias (Zimmerman *et al.*, 2012; Mendoza, 2015).

Por otra parte, la infección respiratoria produce neumonía intersticial proliferativa necrótica, además provoca hiperplasia e hipertrofia de los neumocitos tipo II y presencia de macrófagos necróticos en alveolos pulmonares. Esto produce mayor susceptibilidad a infecciones secundarias, particularmente del sistema respiratorio, entre las que se han observado: *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis*, *Salmonella cholerasuis*, *Pasteurella*

multocida y *Actinobacillus pleuropneumoniae*, virus de la encefalomiocarditis, virus de la influenza porcina Tipo A, Aujeszky, coronavirus respiratorio porcino, paramixovirus porcino, y frecuentemente se presenta una co-infección con circovirus porcino tipo 2, entre otros. Por esta razón, se han descrito diferencias en la gravedad de síntomas clínicos, tras la inoculación experimental de cerdos con diferentes virus aislados de PRRS. La descripción de los signos de infección respiratoria propiamente del PRRSV es inherentemente difícil, precisamente porque los casos a menudo se complican con las infecciones secundarias. (Christianson y Joo, 1994; Charentantanakul, 2006; OIE, 2015).



Figura 5. Signos clínicos observados en cerdos virémicos: hiperemia cutánea con cianosis en orejas, cola y partes distales. Por otra parte, se observan pulmones con neumonía intersticial, así como un aumento de nódulos linfáticos, bazo e hígado aumentados. Hipertrofia de ganglios linfáticos, esplenomegalia y hepatomegalia. Costa Rica, 2018. Por Dr. Ronald Meléndez.

Patogénesis

El virus entra por las vías oronasal y genital; penetra a epitelios nasal y tonsilar, a macrófagos pulmonares y al endometrio uterino. Su período de incubación va de tres días a varias semanas, sumadas con etapas de latencia en casos endémicos, que varía según la edad de los animales, la dosis infectante y la inmunidad. Alcanza los tejidos linfoides regionales y posteriormente se distribuye a nivel sistémico por las vías sanguínea y linfoide, circulando libre o ligado a monocitos circulantes produciendo leucopenia (López-Heydeck *et al.*, 2015).

En el transcurso de la infección con PRRSV se pueden establecer dos fases: la primera se caracteriza por presentar anorexia y letargo en el 5-75% de los animales de todas las edades debido a la viremia aguda, que va de 9 a 15 días y puede alcanzar hasta un mes en animales adultos, y entre 28-35 días en cerdos jóvenes, pudiendo llegar hasta 3 meses, con pico de replicación vírica más o menos conservada entre cepas a nivel pulmonar durante la primera semana de infección; la segunda fase se caracteriza por una infección crónica, con ausencia de viremia, aunque el antígeno vírico puede persistir y ser aislado de los órganos linfoides secundarios incluso hasta 300 días después de la infección (Wills *et al.*, 1997; López-Heydeck *et al.*, 2015; Amarilla *et al.*, 2016).

Un aspecto interesante de la infección por PRRSV es la viremia prolongada, y la consiguiente transmisión de los virus por contacto a animales, en comparación con otras infecciones virales. Los virus desaparecen de la circulación sanguínea con el tiempo, pero se mantiene una infección persistente en los tejidos linfoides (OIE 2015).

La respuesta inmune adaptativa al PRRSV es débil y tardía, en comparación con la de otros patógenos virales porcinos, esto se debe a que el PRRSV infecta algunas células que participan en la respuesta innata, como macrófagos alveolares y células dendríticas, donde se replica y posteriormente las destruye, además logra inhibir la expresión del Interferón (IFN) tipo I e incrementa la expresión de IL-10, lo que permite en cierto grado una evasión a la respuesta innata, y posteriormente conlleva a inmunosupresión. En el caso de la respuesta humoral, en suero de cerdos infectados se pueden encontrar anticuerpos IgM anti-PRRSV entre los días cinco y siete post infección, sin embargo, después de dos o tres semanas son indetectables. Posteriormente se detectan anticuerpos IgG entre los días siete y diez post infección, con incremento entre la segunda y cuarta semanas (Chareerntanakul, 2006; Flores-Mendoza y Hernández, 2010; Mendoza, 2015).

Para el control y la prevención del virus, existe vacunación en el mercado, sin embargo, se ha descrito que en algunos casos sólo induce una protección parcial en los cerdos vacunados, dado que la reducción de la circulación viral tras la vacunación puede estar influenciada por la cepa. En general, las cepas de PRRS más virulentas tienen mayor capacidad de superar la protección ofrecida por las vacunas. La vacuna más utilizada contra el PRRSV emplea virus modificado, atenuado por pasaje múltiple en cultivo celular. En el caso del PRRSV, las vacunas atenuadas son más eficientes en prevenir la viremia que las inactivadas, debido a que inducen mayor respuesta celular y humoral (Flores-Mendoza y Hernández, 2010; OIE

Diagnóstico

Según el Manual de la OIE (2015), existen en el mercado pruebas serológicas, siendo la prueba de ELISA la más utilizada, ya que permite reconocer anticuerpos de los anteriormente denominados genotipos NA y EU del virus, con un alto porcentaje de especificidad, aplicadas al suero o saliva. Por otro lado, la transcripción inversa mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) es una prueba muy sensible para detectar el ARN viral y ahora se utiliza en otros tejidos diferentes y suero. Esta prueba también es útil cuando se dificulta el aislamiento del virus en fluidos como el semen y cuando se usan tejidos parcialmente degradados por autólisis o por calor durante el transporte de las muestras para el aislamiento de los virus. El análisis de los productos amplificados por PCR, ha permitido diferenciar cepas naturales y vacunales del PRRSV, y además se han llevado a cabo estudios epidemiológicos moleculares mediante el análisis filogenético de secuencias (OIE 2015).

El conocimiento del estatus sanitario dentro de una granja, como dentro de un país, con respecto al PRRSV, permite detectar los factores asociados con su incidencia, con el fin de aplicar las medidas adecuadas para el control, y favoreciendo así un aumento en la productividad y en la admisibilidad de los productos de origen porcino en el mercado internacional.

Referencias bibliográficas

- Adams, M. Lefkowitz, E. King, A. Harrach, B. Harrison, R. Knowles, N. Kropinski, A. Krupovic, M. Kuhn, J. Mushegian, A. Nibert, M. Sabanadzovic, S. Sanfaçon, H. Siddell, S. Simmonds, P. Varsani, A. Murilo, F. Gorbalenya, A. & Davison, A. 2017. Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2017). *Arch. Virol.* 162:2505–2538. doi:10.1007/s00705-017-3358-5.
- Amarilla, S. Avalos, A. Suarez, M. Marecos, E. & González, E. 2016. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (Prrs): Epidemiology, Symptoms and Lesions. *Compend. Ciencias Vet.* 5:38–46. doi: 10.18004/compend.cienc.vet.2015.05.02.38-46.
- Bermúdez, Z. 1996. Estudio de Prevalencia de Anticuerpos a: Aujeszky, Peste Porcina Clásica, Gastroenteritis Transmisible, Coronavirus Respiratorio Porcino, Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino en cerdos de Costa Rica. Universidad Nacional. Costa Rica.
- Blaha, T. Blaha, T. Veterinary, P. & Central, B. 2000. The” colorful” epidemiology of PRRS. HAL Id: hal-00902642. Review article The “colorful” epidemiology of PRRS 31:77–83.
- Callén, A. 2004. Control del PRRS en granjas de reproducción. *MG Mundo Ganad.* 163:38–42.
- Castro-Mena, B. 2006. Seroprevalencia del Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino en las Diferentes Etapas de Producción Porcina en una Granja Comercial en Costa Rica. Universidad Nacional. Costa Rica.
- Charerntantanakul, W. 2006. Cell-mediated immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Iowa State University.
- Cho, J.G. & Dee, S.A. 2006. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Theriogenology* 66:655–62. doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.04.024.

- Christianson, W.T. & Joo, H.S. 1994. Porcine reproductive and respiratory syndrome: a review. *Swine Heal. Prod.* 2:10–28. Collins, J. Benfield, D. Christianson, W. McCullough, S. Gorcyca, D. & Chladek, D. 1992. Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 4:117–126. doi:10.1177/104063879200400201.
- Cubillos, R. 2016. El impacto económico del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS). El Sitio Porcino.
- Evans, C.M. Medley, G.F. Green, L.E. Creasey, S.J. & Green, L.E. 2008. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in GB pig herds: Farm characteristics associated with heterogeneity in seroprevalence. *Soc. Vet. Epidemiol. Prev. Med. Proc. a Meet. held London, UK, 1st-3rd April 2009* 4:227–237. doi:10.1186/1746-6148-4-49.
- Fariñas, F. 2012. Inmunidad frente al PRRS. Page in *Symposium Internacional de Porcinocultura II. SEPOR.*
- Flores-Mendoza, L. & Hernández, J. 2010. Vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): writing a history. *Vet. Méx.* 41:139–159.
- García, A. Rodríguez, V. & Kukielka, D. 2007. Aplicación de la RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de PRRS. *Rev. Complut. Ciencias Vet.* 1:646–653. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- Holtkamp, D.J. Kliebenstein, J.B. Neumann, E.J. Zimmerman, J.J. Rotto, H.F. Yoder, T.K. Wang, C. Yeske, P.E. Mowrer, C.L. & Haley, C. a. 2013. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on United States pork producers. *J. Swine Heal. Prod.* 21:72–84.

- Kukielka, D. & Sánchez-Vizcaíno, J.M. 2008. Medidas de manejo del Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino (PRRS) basadas en su diagnóstico molecular. *Rev. Complut. Ciencias Vet.* 2:187–193.
- Kvisgaard, L.K. Hjulsgaard, C.K. Fahnøe, U. Breum, S.T. Ait-Ali, T. & Larsen, L.E. 2013. A fast and robust method for full genome sequencing of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) Type 1 and Type 2. *J. Virol. Methods* 193:697–705. doi: 10.1016/j.jviromet.2013.07.019.
- López-Heydeck, S. Alonso, R. Mendieta, H. & Vásquez, J. 2015. Síndrome reproductivo y respiratorio del cerdo (PRRS). Revisión. *Rev. Mex. Ciencias Pecu.* 6, Núm.1:89.
- Mendoza, E. 2015. Detección y caracterización del virus del Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino en tres granjas de producción intensiva para el establecimiento del control local de la enfermedad.
- Murtaugh, M.P. Elam, M.R. & Kakach, L.T. 1995. Comparison of the structural protein coding sequences of the VR-2332 and Lelystad virus strains of the PRRS virus. *Arch. Virol.* 140:1451–60.
- Music, N. & Gagnon, C. 2010. The role of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus structural and non-structural proteins in virus pathogenesis. *Anim. Health Res. Rev.* 11:135–163. doi:10.1017/S1466252310000034.
- Nodelijk, G. 2002. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) with special reference to clinical aspects and diagnosis: A review. *Vet. Q.* 24:95–100. doi:10.1080/01652176.2002.9695128.
- OIE. 2015. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome.

- Ostrowski, M. Galeota, J.A. Jar, A.M. Platt, K.B. & Osorio, F. 2002. Identification of Neutralizing and Nonneutralizing Epitopes in the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus GP5 Ectodomain. *J. Virol.* 72:4241–4250. doi:10.1128/JVI.76.9.4241–4250.2002.
- Pileri, E. & Mateu, E. 2018. Transmisión Del Virus de Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino Entre Cerdos y Granjas y Su Impacto Sobre La Vacunación <https://www.produccionanimal.com/transmision-del-virus-de-sindrome-reproductivo-y-respiratorio-porcino-entre-cerdos-y-granjas-y-su-impacto-sobre-la-vacunacion/>
- Pineda-Sáenz, N. 2001. Aislamiento y Caracterización del Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRSV) en tres fincas de Costa Rica. Universidad Nacional, Costa Rica.
- Plagemann, P.G. 2004. GP5 ectodomain epitope of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, strain Lelystad virus. *Virus Res.* 102.
- Ramírez, A. 2017. Pérdidas de producción asociadas al PRRS y medidas de erradicación. *Suis* 132.
- Rossow, K.D. 1998. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome. *Vet Pathol* 35:1–20.
- Suárez, P. 1995. Genética Molecular del Virus del Síndrome Reproductor y respiratorio Porcino: Aspectos Evolutivos, Diagnósticos e Inmunógenos. Universidad Complutense de Madrid.
- Terpstra, C. Wensvoort, G. & Pol, J.M.A. 1991. Experimental reproduction of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease) by infection with Lelystad vims: Koch's postulates fulfilled. *Vet. Q.* 13. doi:10.1080/01652176.1991.9694297.

Wensvoort, G. Terpstra, C. Pol, J.M.A. Laak, E.A. Bloemraad, M. de Kluyver, E.P. Kragten, C. & Van Buiten, L. 1991. Mystery swine disease in the Netherlands: The isolation of Lelystad virus. *Vet. Q.* 13 (3):121–130. doi:10.1080/01652176.1991.9694296.

Wills, R.W. Zimmerman, J.J. Yoon, K.J. Swenson, S.L. McGinley, M.J. Hill, H.T. & Platt, K.B. 1997. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: A persistent infection. *Vet. Microbiol.* 55:231–240. doi:10.1016/S0378-1135(96)01337-5.

Yaeger, M. Prieve, T. Collins, J. Hennings, J. Nelson, E. & Benfield, D. 1993. Evidence for the transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in boar semen. *Swine Heal. Prod.* 1:7–9.

Zimmerman, J. Benfield, D. Dee, S. Murtaugh, P. Stadejek, T. Stevenson, G. & Torremorell, M. 2012. *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (Porcine Arterivirus)*. 10th ed. J.J. Zimmerman, L. Karriker, A. Ramirez, K. Schwartz, and G. Stevenson, ed. Wiley-Blackwell, Iowa.

Artículo I

Prevalencia del Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRSV) en cerdas de reemplazo y cerdos de producción de 8, 10 y 12 semanas de edad, en Costa Rica.

Resumen

El Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS) es una enfermedad viral que afecta a los cerdos y que está distribuida en todo el mundo, causando cuantiosas pérdidas económicas en el sector porcicultor. Se han descrito las especies PRRS1 y PRRS2, denominadas anteriormente genotipo europeo (EU) y americano (NA) respectivamente. En Costa Rica se han realizado estudios previos en zonas específicas, pero no existen datos epidemiológicos a nivel nacional. El objetivo de este estudio fue determinar la prevalencia del PRRSV y establecer cuáles son las especies que están circulando en cerdos de producción, en 25 granjas de Costa Rica. Para ello se muestrearon 1278 animales de diferentes edades, Las muestras de suero fueron recolectadas en 256 grupos (pooles) de 5 animales y procesadas por RT-PCR. Se analizó la prevalencia de acuerdo al tamaño de la granja, a la edad de los animales y a la distribución geográfica. La prevalencia general fue de un 13,38% (171/1278). Los animales de granjas pequeñas presentaron mayor prevalencia, con un 37,97%. En cuanto a la edad de los animales, la prevalencia más alta (23,05%) se presentó en los cerdos de 12 semanas. La provincia de Cartago tuvo la prevalencia más alta (34,26%), mientras que en Guanacaste no se detectaron animales positivos. La totalidad de muestras positivas corresponden a PRRS 2 (NA). La prevalencia de la enfermedad es muy variable al considerar los grupos etarios y distribución geográfica analizada, lo cual es consistente con estudios previos tanto a nivel nacional como en otros países.

Palabras clave

Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino, PRRS, prevalencia, Costa Rica, RT-PCR.

Abstract

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is a viral disease that affects pigs. Two species have been described, PRRS1 and PRRS2, which had been previously denominated as European (EU) and North American (NA) genotypes respectively. This disease causes significant economic losses for the swine industry worldwide. In Costa Rica previous epidemiological studies have focused on specific regions, so there is no national prevalence information. The objective of this study is to establish the prevalence of PRRSV in production pigs of Costa Rica. 1278 serum samples collected nationwide were analyzed by RT-PCR and prevalence was grouped according to farm size, age group and geographic distribution. Overall prevalence was 13,38%. Small farm animals had a higher prevalence with 37,97%. According to animal age, the highest prevalence (23,05%) was among 12-week-old pigs. The province of Cartago had the highest prevalence (34,26%). All positive samples belong to the PRRS2 (NA). Results show a large variation between age groups and geographical distribution, which is consistent with previous studies.

Keywords

Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome, PRRS, prevalence, Costa Rica, PCR.

1. Introducción

El Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS) es una enfermedad producida por un virus que lleva el mismo nombre (PRRSV), y que afecta a los cerdos. La enfermedad es causada por un virus envuelto, de aproximadamente 50-65 nm de diámetro, cuyo genoma es un ARN monocatenario (13-15 kb), de polaridad positiva (Rossow, 1998), pertenece al orden Nidovirales, familia *Arteriviridae* y género *Porartevirus*, el cual se ha reclasificado en dos especies: PRRS 1 y PRRS 2 (Adams *et al.*, 2017). El PRRS 1 (anteriormente Lelystad o genotipo europeo - EU), fue aislado por Wensvoort *et al.* (1991), en Europa, y el PRRS 2

(anteriormente VR2332 o genotipo americano - NA), se aisló en 1992, en los Estados Unidos de América (Collins *et al.*, 1992). En el 2017 se ratificó una nueva clasificación dentro la familia Arteriviridae, con la creación del género *Porartevirus* (Adams *et al.*, 2017).

Sus principales características son la alta variabilidad genética y antigénica, viremia prolongada, infecciones persistentes, y la replicación en macrófagos (García *et al.*, 2007). El PRRSV causa una alta mortalidad pre-destete en lechones infectados en el útero, además inmunosupresión y el consiguiente aumento en la susceptibilidad a otras enfermedades infecciosas, particularmente las enfermedades respiratorias en cerdos infectados después del destete. Durante un brote, la mortalidad en los primeros 10 días de vida puede ser tan alta como 80%. Los cerdos de engorde infectados temporalmente comen menos y tienen más problemas respiratorios (Terpstra *et al.*, 1991; Evans *et al.*, 2008).

Por esta razón, el PRRS se ha considerado como uno de los problemas más importantes del sector porcino mundial, ya que causa graves pérdidas económicas, aunque es importante destacar que no afecta a las personas ni altera la calidad de la carne. En la industria porcina de los EE.UU. se han estimado pérdidas de hasta 664 millones de dólares anuales, por el perjuicio en la sanidad de los animales y los costos necesarios para su control (Holtkamp *et al.* 2013).

El virus es muy contagioso y se transmite por diversas vías, como: semen infectado, botas, ropa, equipos, camiones y vehículos contaminados. Una vez en la granja, puede provocar diversos signos clínicos con diferente nivel de severidad, aunque en todos los casos impacta notablemente en los rindes productivos. Las pérdidas en la granja por la forma endémica son

leves, sin embargo, son constantes por la disminución en los índices de fertilidad y de ganancia de peso, y esto incrementa los costos asociándose a otras enfermedades respiratorias (Heydeck *et al.*, 2015; Monterubbianesi, 2017).

Dada la peculiar respuesta inmune y variabilidad genética, en una granja endémica se observan diferentes grupos de animales en cambio constante: 1- animales no infectados, 2- animales en proceso de infección y excreción vírica, 3- animales recuperados de infección y que están protegidos, 4- animales recuperados de infección que pierden la protección y que vuelven a ser susceptibles, 5- animales portadores. Estos grupos son dinámicos, es decir los animales pasan de unos grupos a otros, lo que mantiene la infección en la granja (Callén, 2004).

Este virus fue reportado por primera vez en 1987 en los Estados Unidos de América y Canadá, como una enfermedad de etiología desconocida que llamaron “Enfermedad Misteriosa del Cerdo”, y posteriormente se reportaron los primeros casos en Europa, en 1990. Después de una fase epidémica grave, la enfermedad se convirtió en endémica en algunos países de Europa. Actualmente se encuentra distribuida por todo el mundo, en casi todos los países productores de cerdos, permaneciendo endémico en su mayoría (Terpstra *et al.*, 1991; Wensvoort *et al.*, 1991).

En Europa, los países que están libres de PRRSV incluyen Suiza, Suecia, Islandia, Noruega y Finlandia. En América, Argentina y Brasil no reportan casos de PRRS, al igual que Australia y Nueva Zelanda. En regiones infectadas con alta densidad de pjaras, en general el 60 %-80 % de los grupos suele estar infectado. La mayoría de los países europeos solo

tiene cepas de PRRS 1, pero en algunos como Dinamarca, Alemania, Hungría o Polonia se han aislado cepas de ambas especies. Por su parte, el PRRS 2 es el más prevalente en América y Asia (Nodelijk, 2002; Ramírez, 2017).

Estudios de seroprevalencia realizados en Costa Rica, han reportado la presencia del virus en zonas específicas: Bermúdez (1996), Pineda-Sáenz (2001) y Castro-Mena (2006), sin embargo, no existen datos a nivel nacional, ni estudios basados en análisis molecular. El objetivo de esta investigación fue determinar por primera vez la prevalencia del virus de PRRS, y establecer cuáles son las especies circulantes en las granjas de producción en Costa Rica.

2. Materiales y métodos

2.1 Diseño de estudio

Este estudio es de tipo transversal descriptivo, diseñado para obtener la prevalencia de PRRSV en granjas de producción, distribuidas en las principales zonas de actividad porcicultora de Costa Rica.

2.1.1 Muestreo y análisis de resultados

En la actualidad, el Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA), cuenta con el Sistema de Registros Agropecuarios (SIREA), en el cual están registradas un total de 3521 granjas porcinas, de las cuales 14 están identificadas como grandes (>500 vientres), 82 como medianas (200-500 vientres) y 3425 como pequeñas (<200 vientres). Para la selección de las granjas se utilizó la información registrada en el SIREA, con el fin de garantizar la mayor

representatividad. Se realizó un muestreo estratificado por número de vientres a nivel nacional, y se distribuyó el tamaño total de muestras por afijación proporcional.

Durante el segundo semestre del año 2015 y el primer semestre del año 2016, se colectaron en cada una de las granjas, entre 40 y 70 muestras de suero, de acuerdo al tamaño de la granja. Para este estudio se utilizaron 8 granjas grandes, 12 granjas medianas y 5 granjas pequeñas, para un total de 25 granjas, distribuidas en las 7 provincias de Costa Rica. Para garantizar la representatividad de los resultados, se incluyó al menos una granja grande y una granja mediana por cada provincia.

La selección de los grupos etarios se determinó en base a datos obtenidos en un estudio previo realizado en el año 2015, sobre la edad de inicio y los picos más altos de viremia. En esta investigación se realizó un muestreo en 9 granjas conocidas positivas, y se analizaron animales de 1 a 15 semanas de edad, donde se determinó que los grupos etarios que presentaban mayores picos de viremia, estaban comprendidos entre las semanas 8 y 14. Este estudio fue publicado posteriormente por Meléndez *et al* (2018).

Para establecer el tamaño de la muestra, se utilizó la fórmula que estima la prevalencia esperada, con un nivel de confianza del 95%, una prevalencia del 10% y un error aceptado del 2%, lo que determinó una muestra de 865 animales, utilizando el software Win Episcopy 2.0 (Thrusfield *et al.*, 2001); sin embargo, en total se analizaron 1278 sueros, obtenidos de cerdos provenientes de las granjas seleccionadas.

Se estimó la prevalencia general de granjas y de animales positivos, además se realizaron cálculos de prevalencia de acuerdo al tamaño de las granjas, por provincias y por estratos de edad.

2.1 Sujetos de estudio

Cerdos de 8, 10 y 12 semanas, además de cerdas de reemplazo (25% cada estrato), presentes en las granjas de producción ubicadas en las principales zonas de actividad porcicultora Costa Rica.

2.1.3 Criterios de inclusión

Se incluyeron únicamente granjas grandes, medianas y pequeñas con más de 100 vientres y que cuenten con registros reproductivos.

Para la selección de los individuos dentro de cada granja, se incluyeron cerdas de reemplazo y cerdos de ambos sexos, con edades correspondientes a 8, 10 y 12 semanas.

2.2 Análisis molecular

Para el análisis molecular, se procesaron 1278 muestras de suero, en 256 grupos (pooles) de 5 sueros. Posteriormente, las muestras correspondientes a los pooles positivos, se analizaron por separado, para identificar los individuos positivos y realizar los cálculos de prevalencia.

La extracción del ARN viral de las muestras se realizó utilizando el kit MagMax Pathogen RNA/DNA en el equipo automatizado MagMAXTM Express 96, ambos de Applied Biosystems (Life Technologies, Carlsbad, USA), siguiendo las especificaciones de los fabricantes (Applied Biosystems, 2011).

Para las pruebas de RT-PCR en tiempo real, se utilizó el kit comercial VetMAX™ NA and EU PRRSV Reagents (One Step qRT-PCR para detección de ARN de PRRSV NA y EU), Applied Biosystems (Life Technologies, Carlsbad, USA), siguiendo las indicaciones del fabricante. De acuerdo a la información reportada por éste, las pruebas de este kit muestran una sensibilidad del 99.5% y una especificidad del 99.6% (Applied Biosystems, 2019).

Una vez preparadas las mezclas de reacción, éstas se procesaron en un termociclador de PCR Tiempo Real QuantStudio 6 Flex, Applied Biosystems (Life Technologies, Carlsbad, USA). El programa de RT-PCR utilizado fue el siguiente: 45°C- 600s, 95°C- 600s, 40 ciclos a 95° - 15s, 60° - 70s.

3. Resultados

Del total de granjas analizadas (n=25), 36% (9/25) resultaron positivas. De acuerdo al tamaño de la granja, resultaron positivas un 50% (5/10) de las granjas grandes, en las medianas 58.33% (7/12) y en las pequeñas un 33.33% (1/3) (Tabla 1).

De acuerdo a la distribución de granjas por provincia, en la Tabla 1 se puede observar, que la mayor prevalencia se presenta en Alajuela, con un 57.14% (4/7), y la menor se obtuvo en Guanacaste, que no presenta ninguna granja positiva (0/2).

En cuanto a las muestras provenientes de estas granjas (n=1278), 34 pooles fueron positivos, y al analizar estos sueros individualmente, se obtuvieron un total de 171 muestras positivas, para una prevalencia general de 13,38% (IC=11,56-15,41). La totalidad de las

muestras positivas corresponden a PRRS 2, no se obtuvieron resultados positivos a PRRS 1 (Tabla 1).

Según el tamaño de las granjas, se determinó que la prevalencia más alta (37,97%), se presentó en establecimientos con menos de 200 animales. En cuanto a la edad de los animales, la prevalencia más alta se obtuvo en los cerdos de 12 semanas, mientras que la más baja se presentó en las cerdas reproductoras (Tabla 1).

De acuerdo a la distribución del virus por provincia, Cartago presenta la prevalencia más alta, con un 34,26%. Guanacaste, fue la única provincia que no presentó muestras positivas (Tabla 1).

Tabla 1. Prevalencia de PRRSV en granjas de producción de Costa Rica.

Características generales	Granjas			Animales		
	Positivo	Total	%	Positivo	Total	Prevalencia (%)
Tamaño de la granja						
Grande	5	10	50.00	60	486	12,35
Mediana	7	12	58.33	81	713	11,36
Pequeña	1	3	33.33	30	79	37,97
Provincia						
Cartago	1	2	50.00	37	108	34,26
Heredia	1	2	50.00	19	90	21,11
Puntarenas	1	4	25.00	30	183	16,39
Alajuela	4	7	57.14	55	372	14,78
Limón	1	3	33.33	23	173	13,29
San José	1	5	20.00	7	225	3,11
Guanacaste	0	2	0	0	127	0,00
Edad						
8 semanas	.	.		27	307	8,79
10 semanas	.	.		56	295	18,98
12 semanas	.	.		74	321	23,05
Reproductores	.	.		14	355	3,94

En la Figura 1 se muestra la distribución geográfica de las granjas positivas (rojo) y negativas (verde), de acuerdo a la provincia y el relieve.

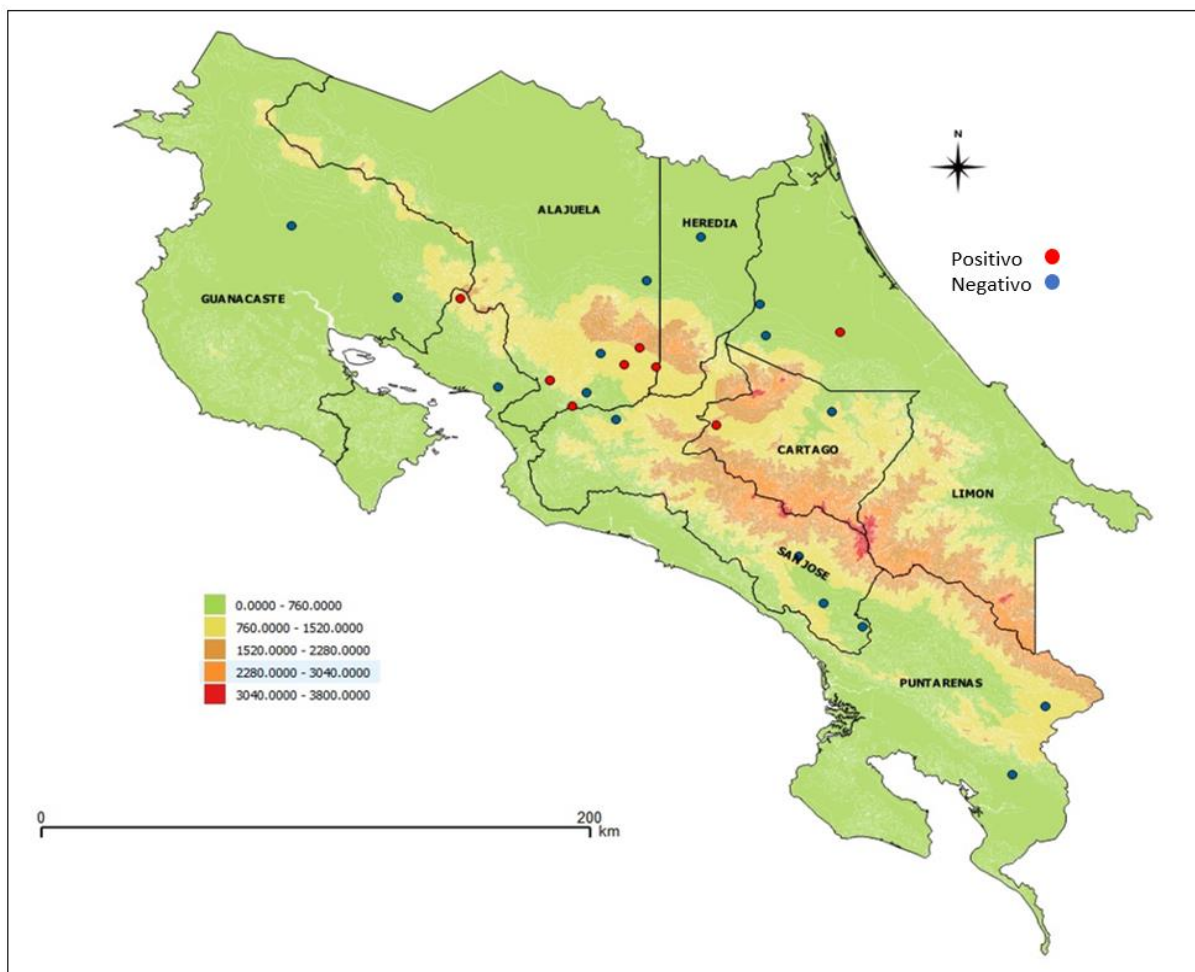


Figura 1. Mapa de distribución de granjas positivas y negativas a PRRSV

4. Discusión

En este estudio se determinó una prevalencia general de granjas positivas del 36% (9/25), donde se puede observar que Alajuela es la provincia con la mayor prevalencia y Guanacaste, la única provincia en la que no se detectó el PRRSV. Alajuela es la provincia con más presencia de granjas porcinas en el país y por esta razón, fue donde se muestrearon más

granjas, las cuales además presentan gran cercanía geográfica entre ellas. Por lo tanto, podrían estar compartiendo animales, semen o alimentos, y esto facilita la transmisión del virus, lo cual explica que sea la provincia con mayor prevalencia de granjas positivas.

En el caso de los animales positivos, la prevalencia general es del 13,38% (171/1278), la prevalencia más alta se presentó en Cartago y la más baja en Guanacaste, donde no se obtuvieron resultados positivos. A pesar de que en Costa Rica este virus es bien conocido, el diagnóstico molecular de PRRSV por RT-PCR es limitado, ya que se realiza en casos aislados, en pocos laboratorios y sin fines de investigación, por lo que la información en el país sobre presencia y distribución del virus es escasa.

De acuerdo con los estudios realizados anteriormente en Costa Rica, se observa que Bermúdez (1996) reportó una seroprevalencia entre el 1.3% y el 69.6% en 11 fincas de las 15 que fueron muestreadas en todo el territorio nacional; por su parte Ugalde (1998) obtuvo una seroprevalencia de 38.55%. En el 2001, Pineda-Sáenz reportó seroprevalencias en 3 fincas comerciales, con valores entre 2.7% y 92.28%, y hasta 25 variables antigénicas en una misma finca; y Castro-Mena (2006) arrojó valores entre 53.13% y 93.75% en diferentes edades. No se encontraron referencias de zonas geográficas en estos estudios, por lo que no es posible realizar comparaciones de este tipo.

Asimismo, en Colombia, (Cruz *et al.*, 2006), determinaron una seroprevalencia de 4,3% en explotaciones extensivas. En México (Rovelo *et al.*, 2010) reportaron una prevalencia de 39,4%, y entre las granjas varió de 0% a 100%, demostrando una gran variabilidad en los datos obtenidos. Esto es consistente con lo hallado en otros estudios de seroprevalencia, en áreas donde la infección es endémica. Como se puede observar, los valores reportados en los

estudios realizados anteriormente, tanto en Costa Rica como en otros países, son sumamente variables, lo que dificulta la comparación si se toman en cuenta algunos factores que pueden influir en la dinámica del virus, tales como: bioseguridad, grado de tecnificación, manejo, programas sanitarios, condiciones ambientales, entre otros.

Además, existen algunas limitaciones a la hora de interpretar datos serológicos, debido a que los anticuerpos anti-PRRSV (detectables por ELISA) surgen aproximadamente entre 9 y 13 días después de la infección y se deterioran con el tiempo, persistiendo hasta por 28 meses. La mayoría de los cerdos eliminan el virus dentro de los 3-4 meses posteriores a la exposición, por lo que muchos de los cerdos positivos al anticuerpo contra el PRRSV son virus negativos (Evans *et al.*, 2008). Por esta razón, este tipo de información será muy útil para medir exposición al PRRS o confirmar que los cerdos fueron vacunados en países donde se utilizan vacunas, pero no para afirmar la presencia de la infección en el momento de la obtención de la muestra. No obstante, los estudios serológicos y el resultado de RT-PCR descrito en este estudio, indican que las prevalencias de PRRS en las granjas no son homogéneas, lo cual puede ser el resultado de mal manejo en el control del virus o cepas que varían su nivel de patogenicidad.

La técnica RT-PCR posee la limitante que sólo detecta el virus en fase virémica, sin embargo, tiene la ventaja que permite detectar infecciones tempranas, y se puede utilizar para analizar diferentes matrices sin necesidad de detectar cambios en la respuesta inmune humoral (Christopher-Hennings *et al.*, 2002). Por lo tanto, la prevalencia obtenida en este estudio aporta información nueva para la toma de decisiones en el país, como futuros muestreos y manejo de las granjas, ya que únicamente existen datos basados en análisis serológicos.

Otro aspecto a considerar es la distribución geográfica del virus, ya que, a pesar de que la mayoría de granjas de producción porcicultora se encuentra en la provincia de Alajuela (MEIC, 2015), la mayor prevalencia de animales positivos se encontró en Cartago (34,26%) y la menor en Guanacaste (0%). No obstante, como se puede observar en la Figura 1, la mayoría de las granjas positivas se concentran en la zona central del país, con mayor altitud y donde las temperaturas son más bajas, y alejadas de las costas. Según el Instituto Meteorológico Nacional (IMN, 2015), durante el segundo semestre del año 2015 las temperaturas más altas se presentaron en la provincia de Guanacaste (32,8°C – 35,8°C), y las más bajas en la provincia de Cartago (15,6°C - 24,8°C). De acuerdo al estudio de (Hermann *et al.*, 2007), donde se determinó la estabilidad del PRRSV transmitido por el aire en función de la temperatura y la humedad relativa, y se estableció que el virus en aerosol fue menos estable a 41°C y más estable 5°C. Por su parte, Jacobs *et al.* (2010) realizaron un estudio, donde determinaron que la vida media del PRRSV infeccioso, decrece notablemente conforme aumenta la temperatura (mediciones a 4, 10, 20 y 30°C). Esto lleva a concluir que puede ser de gran utilidad, realizar en el país investigaciones del PRRSV, relacionadas con factores climáticos como temperatura y humedad.

En cuanto a la edad de los cerdos, se determinó que la prevalencia más alta se encuentra en animales de 10 (18,98%) y 12 (23,05%) semanas de edad, y la más baja en cerdas de reemplazo (3,94%), lo que concuerda con lo reportado por Castro-Mena (2006), donde se observa que los cerdos de 6 semanas presentan un 0% de seropositividad, mientras que la mayor seroprevalencia se obtuvo en animales de 10 a 18 semanas. Por su parte Duinhof *et al* (2011), en un estudio enfocado a identificar el grupo etario más efectivo para detectar la circulación del virus en cerdos holandeses, donde se muestrearon animales entre 8 y 22

semanas, se obtuvo la mayor prevalencia en cerdos de 9 a 16 semanas, con un rango que varió de 0% a 100% entre hatos. Igualmente existe concordancia con lo reportado por Salinas *et al.* (2008) en México, donde se comparó la prevalencia en etapas de reproducción y de engorde, y reportaron valores de 56% en la etapa de producción y 14% en la etapa reproductiva.

Generalmente se reporta que los cerdos están sanos en el tiempo de destete, pero se ven afectados clínicamente de 3 a 4 semanas después, con la aparición de síntomas como: fiebre, anorexia, letargo, disnea, entre otros (Cuartero *et al.*, 2002). Dee *et al.* (1996) realizaron un estudio de seroprevalencia, en el cual reportaron que todos los cerdos analizados dentro de una semana después del destete, con edades entre 18 y 22 días, eran seronegativos, mientras que del 80 al 100 por ciento de los cerdos evaluados de ocho a nueve semanas, presentaban títulos de anticuerpos, lo cual concuerda con los datos obtenidos en esta investigación, donde se observa que los animales de ocho semanas ya presentan resultados de viremia positiva.

Cabe destacar que las cerdas de reemplazo presentaron los porcentajes más bajos de prevalencia en la mayoría de las granjas, lo cual coincide con estudios realizados por Klinge *et al.* (2009), en el cual se inocularon cerdos de diferentes edades con cepas de variada virulencia, y se evidenció que los lechones de tres semanas de vida tenían viremias significativamente más largas que los cerdos adultos, independientemente de la cepa de PRRSV utilizada para la inoculación. Asimismo, los cerdos de dos meses tenían cargas víricas significativamente mayores en diferentes tejidos, comparados con los animales de seis meses, independientemente de la virulencia de la cepa utilizada en el desafío. Estos hallazgos muestran que la edad del animal influye en el resultado de la infección aguda por PRRSV, debido al aumento de la resistencia inmune innata, mientras que una respuesta de anticuerpos

se desencadena a un umbral bajo de infección que es independiente de la edad. Las respuestas de anticuerpos equivalentes se obtuvieron en respuesta a virus virulentos y atenuados, lo que indica que la masa antigénica necesaria para una respuesta inmunitaria se produce en un nivel bajo de infección y no se predice el estado virémico. Por otra parte, para un adecuado control y prevención en la granja, se utilizan estrategias que permitan minimizar la circulación del virus dentro de la misma, y una de estas es la selección de cerdas sanas o previamente aisladas, aclimatadas y recuperadas, para pie de cría. Por lo tanto, van a ser eliminadas como reemplazos, las cerdas con problemas asociados a la enfermedad (Cho y Dee, 2006; Klinge *et al.*, 2009; Mendoza, 2015).

El presente estudio permitió establecer la prevalencia del PRRSV en los cerdos de producción de Costa Rica, además que se logró identificar la especie circulante en el país (PRRS 2).

5. Conclusiones

- La prevalencia obtenida en este estudio aporta información nueva para la toma de decisiones en el país, ya que únicamente existen datos basados en análisis serológicos.
- En Costa Rica solamente circulan cepas de la especie PRRS 2.
- Alajuela es la provincia con mayor número de granjas positivas, sin embargo, en Cartago se presentó la mayor prevalencia de cerdos virémicos (34,26%), y Guanacaste presenta la menor (0%).
- El PRRSV es más prevalente en zonas con temperatura más baja (Cartago), que en zonas con altas temperaturas (Guanacaste).

- En cuanto a la edad de los cerdos, la prevalencia más alta se presenta en animales de 10 (18,98%) y 12 (23,05%) semanas de edad, y la más baja en cerdas de reemplazo (3,94%).

6. Recomendaciones

La información presentada en este estudio sobre la edad y las zonas geográficas de mayor prevalencia, se puede utilizar para realizar un muestreo del virus durante un brote o en casos que se requiera determinar presencia/ausencia de la enfermedad.

Estos resultados sobre población etaria y las posibles zonas geográficas con mayor riesgo de contagio, permiten focalizar las medidas preventivas, promover el uso de diferentes métodos diagnósticos y establecer medidas de bioseguridad que permitan un control y manejo adecuado en las granjas.

7. Referencias bibliográficas

- Adams, M. Lefkowitz, E. King, A. Harrach, B. Harrison, R. Knowles, N. Kropinski, A. Krupovic, M. Kuhn, J. Mushegian, A. Nibert, M. Sabanadzovic, S. Sanfaçon, H. Siddell, S. Simmonds, P. Varsani, A. Murilo, F. Gorbalenya, A. & Davison, A. 2017. Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2017). *Arch. Virol.* 162:2505–2538. doi:10.1007/s00705-017-3358-5
- Applied Biosystems. 2011. MagMAX™ Pathogen RNA/DNA Kit Protocol (PN 4463379B)
- Applied Biosystems. 2019. VetMAX PRRSV EU & NA 2.0 Kit
- Bermúdez, Z. 1996. Estudio de Prevalencia de Anticuerpos a: Aujeszky, Peste Porcina Clásica, Gastroenteritis Transmisible, Coronavirus Respiratorio Porcino, Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino en cerdos de Costa Rica. Universidad Nacional. Costa Rica.
- Callén, A. 2004. Control del PRRS en granjas de reproducción. *MG Mundo Ganad.* 163:38–42.
- Castro-Mena, B. 2006. Seroprevalencia del Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino en las Diferentes Etapas de Producción Porcina en una Granja Comercial en Costa Rica. Universidad Nacional. Costa Rica.
- Cho, J.G. & Dee, S.A. 2006. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Theriogenology* 66:655–62. doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.04.024.

- Christopher-Hennings, J. Faaberg, K.S. Murtaugh, M.P. Nelson, E.A. Roof, M.B. Vaughn, E.M. Yoon, K.J. & Zimmerman, J.J. 2002. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) diagnostics: Interpretation and limitations. *J Swine Heal. Prod* 10:213–218.
- Collins, J. Benfield, D. Christianson, W. McCullough, S. Gorcyca, D. & Chladek, D. 1992. Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 4:117–126. doi:10.1177/104063879200400201.
- Cruz, M. Mogollón, J. Rincón, M. Peña, N. Ruiz, S. & Lora, A. 2006. Prevalencia Serológica del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS) en Cerdos de Explotaciones Extensivas de Colombia. *Rev. Med. Vet. Zoot.* 2006 53:33:41.
- Cuartero, L. Dee, S. Acvm, D. Deen, J. Abvp, D. Ruiz, A. & Pijoan, C. 2002. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus (PRRSV) 10:118–121.
- Dee, S.A. Joo, H.S. Henry, S. Tokach, L. Park, B.K. Molitor, T. & Pijoan, C. 1996. Detecting subpopulations after PRRS virus infection in large breeding herds using multiple serologic tests. *Swine Heal. Prod* 4:181–184.
- Duinhof, T.F. van Schaik, G. van Esch, E.J.B. & Wellenberg, G.J. 2011. Detection of PRRSV circulation in herds without clinical signs of PRRS: Comparison of five age groups to assess the preferred age group and sample size. *Vet. Microbiol.* 150:180–184. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.01.001.
- Evans, C.M. Medley, G.F. & Green, L.E. 2008. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in GB pig herds: Farm characteristics associated with heterogeneity in seroprevalence. *BMC Vet. Res.* 4:1–11. doi:10.1186/1746-6148-4-49.

- Evans, C.M. Medley, G.F. Green, L.E. Creasey, S.J. & Green, L.E. 2008. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in GB pig herds: Farm characteristics associated with heterogeneity in seroprevalence. *Soc. Vet. Epidemiol. Prev. Med. Proc. a Meet. held London, UK, 1st-3rd April 2009* 4:227–237. doi:10.1186/1746-6148-4-49.
- García, A. Rodríguez, V. & Kukielka, D. 2007. Aplicación de la RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de PRRS. *Rev. Complut. Ciencias Vet.* 1:646–653. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- Hermann, J. Hoff, S. Muñoz, C. Yoon, K. Roof, M. Burkhardt, A. & Zimmerman, J. 2007. Effect of temperature and relative humidity on the stability of infectious porcine reproductive and respiratory syndrome virus in aerosols. *Vet. Res* 38:81–93. doi:10.1051/vetres:2006044.
- Heydeck, S. Alonso, R. Mendieta, H. & Vásquez, J. 2015. Síndrome reproductivo y respiratorio del cerdo (PRRS). Revisión. *Rev. Mex. Ciencias Pecu.* 6, Núm.1:89.
- Holtkamp, D.J. Kliebenstein, J.B. Neumann, E.J. Zimmerman, J.J. Rotto, H.F. Yoder, T.K. Wang, C. Yeske, P.E. Mowrer, C.L. & Haley, C. a. 2013. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on United States pork producers. *J. Swine Heal. Prod.* 21:72–84.
- IMN. 2015. Contenido Página. *Inst. Meteorológico Nac.* 1–44. doi:10.1111/j.1420-9101.2009.01929. x.
- Jacobs, A. Hermann, J. Muñoz, C. Prickett, J. Roof, M. Yoon, K.J. & Zimmerman, J. 2010. Stability of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus at ambient temperatures. *J. Vet Diagn Invest* 22:257–260.

- Klinge, L. Vaughn, M. Roof, M. Bautista, E. & Murtaugh, M. 2009. Age-dependent resistance to Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication in swine. *Virology*. 6:1–11. doi:10.1186/1743-422X-6-177.
- MEIC. 2015. Estudio sobre el mercado de la carne porcina en Costa Rica. *Dir. Investig. Económicas y Mercados* 1–82.
- Meléndez, R, Guzmán.M, Jiménez.C, Piche.M, Jiménez. E, León.B, Cordero.JM, Ramíre.L, Uribe.A, Van Nes.A, Stegeman. A, Romero. JJ., 2018. Characterization of PRRS virus and epidemiological aspects in swine farms in Costa Rica. [WWW Document]. ESPHM. URL
- Mendoza, E. 2015. Detección y caracterización del virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino en tres granjas de producción intensiva para el establecimiento del control local de la enfermedad.
- Monterubbiansi, M. 2017. Mantener El País Libre de PRRS Es Tarea de Todos.<https://horizonteadigital.com/mantener-el-pais-libre-de-prrs-es-tarea-de-todos-vet-mariela-monterubbiansi/>.
- Nodelijk, G. 2002. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) with special reference to clinical aspects and diagnosis: A review. *Vet. Q.* 24:95–100. doi:10.1080/01652176.2002.9695128.
- Pineda-Sáenz, N. 2001. Aislamiento y Caracterización del Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRSV) en tres fincas de Costa Rica. Universidad Nacional, Costa Rica.
- Ramírez, A. 2017. Pérdidas de producción asociadas al PRRS y medidas de erradicación. *Suis* 132.

- Rossow, K.D. 1998. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome. *Vet. Pathol.* 35:1–20.
- Rovelo, A. Alzina, A. Rodríguez, J. Segura, J. & Villegas, S. 2010. Prevalencia y Factores de Riesgo asociados con el Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino en Sementales de Granjas Porcinas en el Sureste de México. *Rev. Científica, FCV-LUZ XX:17–23.*
- Salinas, J. J., L. Flores, H. Ávalos, R. Zárate, J. Riojas, V. & Segura, J. 2008. Presencia de animales seropositivos al síndrome reproductivo y respiratorio porcino en Nuevo León. *Vet. Méx* 39.
- Terpstra, C. Wensvoort, G. & Pol, J.M.A. 1991. Experimental reproduction of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease) by infection with Lelystad virus: Koch's postulates fulfilled. *Vet. Q.* 13. doi:10.1080/01652176.1991.9694297.
- Thrusfield, M. Ortega, C. de Blas, I. Noordhuizen, J.P. & Frankena, K. 2001. WIN EPISCOPE 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. *Vet. Rec.* 148:567–72.
- Ugalde, L. 1998. Estudio transversal de la relación entre la seroprevalencia de anticuerpos a Parvovirus Porcino, Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino, Virus de la Enfermedad de Aujeszky y Paramyxovirus La Piedad-Michoacán, y parámetros reproductivos. Universidad Nacional. Costa Rica.
- Wensvoort, G. Terpstra, C. Pol, J.M.A. Laak, E.A. Bloemraad, M. de Kluyver, E.P. Kragten, C. & Van Buiten, L. 1991. Mystery swine disease in the Netherlands: The isolation of Lelystad virus. *Vet. Q.* 13 (3):121–130. doi:10.1080/01652176.1991.9694296.

Artículo II

Caracterización molecular del Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRSV) en cerdos de producción de Costa Rica.

Resumen

El Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS) es producido por el virus (PRRSV) que afecta a los cerdos, el cual pertenece al orden Nidovirales, familia Arteriviridae, género *Porartevirus*, recientemente reclasificado en dos especies: PRRS 1 y PRRS 2. El genoma viral contiene diez marcos de lectura abierta (ORF), de los cuales en esta investigación se ha utilizado el ORF 5, que codifica para la proteína estructural GP5, ya que es la más heterogénea, con 88%-99% de identidad de aminoácidos entre cepas de la misma especie, y 52%-55% de identidad entre especies, por lo que se utiliza frecuentemente para realizar estudios filogenéticos del PRRSV. En este estudio, se secuenciaron 18 muestras positivas a PRRSV para establecer las relaciones filogenéticas y para analizar la distribución geográfica de algunas cepas presentes en Costa Rica. Se obtuvieron 8 secuencias, de 5 diferentes provincias del país: San José, Alajuela, Cartago, Heredia y Puntarenas. Las secuencias obtenidas se agruparon en tres diferentes cluster. Las muestras de San José, Alajuela y Puntarenas están más estrechamente emparentadas, ya que comparten ancestros comunes entre ellas, sin embargo, las muestras de Heredia y Cartago se ubican en cluster completamente separados, por lo que se concluye que el virus presenta tres diferentes orígenes y épocas de ingreso al país. La muestra proveniente de Cartago es la más ancestral, ya que está estrechamente relacionada con el grupo externo utilizado para enraizar el árbol (PRRS 1). Por el contrario, las muestras de Heredia presentan una mayor distancia genética con respecto al grupo externo, y al resto de secuencias de Costa Rica por lo que pueden ser las más divergentes.

Palabras clave: Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino, PRRS, ORF5, Costa Rica.

Abstract

Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) is caused by a virus (PRRSV) that affects pigs. The virus belongs to the order Nidovirales, family *Arteriviridae*, genus *Porartevirus*, it has been recently reclassified into two species: PRRS 1 and PRRS 2. The genome viral contains ten open reading frames (ORF). ORF 5 codes for the GP5 structural protein and it has been used in this investigation to carry out phylogenetic studies of PRRSV as it is the most heterogeneous protein, with 88% -99% amino acid identity among strains of the same species, and 52% to 55% identity across species. Sanger sequencing of 18 positive samples was carried out analyzed to construct a phylogenetic tree. 8 sequences were included in the study representing 5 different provinces of the country: San José, Alajuela, Cartago, Heredia and Puntarenas. The sequences obtained grouped into three different clusters. The samples of San José, Alajuela and Puntarenas are closely related, since they share common ancestors. Samples of Heredia and Cartago are located in completely separate clusters, so it suggests that the virus has three different origins and times of entry to the country. The sample from Cartago is the most ancestral, since it is closely related to the outgroup used to root the tree (PRRS 1). On the contrary, the Heredia samples present a greater genetic distance with respect to the external group, and the rest of Costa Rica's sequences, so they may be the most divergent.

Keywords

Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome, PRRS, ORF5, Costa Rica.

1. Introducción

El Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS) es producido por un virus (PRRSV) que afecta a los cerdos, el cual pertenece al orden Nidovirales, familia *Arteriviridae*, género *Porartevirus*; y recientemente, se ha reclasificado en dos especies: PRRS 1 y PRRS 2, anteriormente Lelystad o genotipo europeo y VR2332 o genotipo

americano, respectivamente; que comparten aproximadamente el 63% de similitud de nucleótidos. La variabilidad en la secuencia de nucleótidos es mayor en algunos genes, y es ahí donde se diferencian ambas especies. Se ha identificado que existe una gran diversidad genética de cepas, lo cual ocasiona problemas en la vacunación y en el diagnóstico. Aun cuando en la infección clínicamente se manifiestan de manera similar, difieren significativamente en términos de propiedades antigénicas y contenido genético, pudiendo presentarse rápidas variaciones genéticas o recombinaciones (Wensvoort *et al.*, 1991; Collins *et al.*, 1992; López-Heydeck *et al.*, 2015; Adams *et al.*, 2017).

El PRRSV es un virus envuelto de aproximadamente 50-65 nm de diámetro, ARN monocatenario (13-15 kb), de polaridad positiva, y sus principales características son la variabilidad genética y antigénica, viremia prolongada, infecciones persistentes, y la replicación en macrófagos (Rossow, 1998).

El genoma viral contiene diez marcos de lectura abierta (ORF por sus siglas en inglés), que se transcriben en las células como un conjunto anidado de ARNm subgenómicos. El ORF 1a y ORF 1b que están situados en el extremo 5' del genoma, representan casi el 75% del genoma viral y codifican para 2 poliproteínas que son cortadas por proteasas, produciendo al menos 12 proteínas no estructurales, entre las que se encuentran helicasas, inhibidores de interferón (INF), proteínas regulatorias, y la ARN polimerasa dependiente de ARN, entre otras. Las principales proteínas estructurales consisten en una glicoproteína de envoltura de 25 kDa (GP5), una proteína de 18-19 kDa de membrana no glicosilada (M), y una proteína de 15 kDa de la nucleocápside (N), las cuales son codificadas por los ORF 5, 6 y 7, respectivamente (Suárez, 1995; Kukielka y Sánchez-Vizcaíno, 2008; Music y Gagnon 2010; Kvisgaard *et al.*, 2013).

La proteína de la nucleocápside (N), es la más abundante y conservada del virión, y es altamente antigénica, lo que permite que sea adecuada para la detección de anticuerpos específicos del virus y otras técnicas de diagnóstico de la enfermedad. Además, se ha identificado un sitio antigénico conformacional común para las PRRS1 y PPRS2, que se localiza en la región central de esta proteína, permitiendo una detección más amplia de variantes (Music y Gagnon, 2010).

La GP5 es una proteína transmembranal glicosilada, y es la más heterogénea, con 88%-99% de identidad de aminoácidos entre cepas de la misma especie, y 52%-55% de identidad entre especies (PRRS1 y PPRS2). La GP5 y la proteína M forman un heterodímero con uniones de puentes disulfuro, que podría estar involucrado en la unión al receptor celular. La proteína M contiene el epítipo inmunodominante (epítipo A), mientras que la GP5 contiene el epítipo neutralizante más importante (epítipo B). Los cerdos infectados con PRRSV primero desarrollan anticuerpos no neutralizantes contra el epítipo A y los anticuerpos neutralizantes que se dirigen al epítipo B aparecen más tarde en la respuesta inmune (aproximadamente cuatro semanas después), cuando se elimina el PRRSV del animal. Por lo tanto, el epítipo A funciona como señuelo del virus, distraendo de manera momentánea la respuesta neutralizante. El epítipo B se conserva entre los aislados, lo que lo convierte en un objetivo adecuado para una vacuna más eficaz contra el PRRSV. (Murtaugh *et al.*, 1995; Ostrowski *et al.*, 2002; Plagemann, 2004; Flores-Mendoza y Hernández, 2010).

Los estudios genéticos de aislamientos de PRRSV han documentado que el virus es altamente diverso. En América del Norte se han obtenido aislamientos que presentan una marcada variabilidad, tanto antigénicamente como genéticamente. Por lo tanto, cobra importancia la necesidad de realizar análisis sobre la estructura genética del virus, ya que

permite indicar qué vacunas desarrolladas contra las cepas del virus pueden no ser eficaces, además que permite desarrollar estrategias de manejo y control para áreas específicas (Goldberg *et al.*, 2000).

El análisis de los productos amplificados por PCR, ha permitido diferenciar cepas naturales y vacunales del PRRSV, y más recientemente se han llevado a cabo estudios epidemiológicos moleculares, mediante el análisis filogenético de secuencias específicas de genes estructurales (OIE, 2015).

El objetivo de esta investigación fue realizar la caracterización molecular del virus, utilizando el ORF5, para la determinación de las especies y las cepas circulantes en Costa Rica.

2. Materiales y métodos

Para la caracterización molecular del virus, se seleccionaron 18 muestras de suero, positivas a RT-PCR provenientes de 9 granjas, pertenecientes a diferentes regiones representativas de Costa Rica.

La extracción del ARN viral de las muestras se realizó utilizando el kit MagMax Pathogen RNA/DNA en el equipo automatizado MagMAXTM Express 96, ambos de Applied Biosystems (Life Technologies, Carlsbad, USA), siguiendo las especificaciones de los fabricantes (Applied Biosystems, 2011).

Para las reacciones de amplificación, se utilizaron los cebadores internos y externos (PRRS OUT y PRRS IN), correspondientes a ORF5, descritos en el Cuadro 1; junto con el

kit comercial Superscript III One-Step RT-PCR Platinum Taq HiFi, de la marca Invitrogen, Cat. 12574-035 (Invitrogen Life Technologies, 2010), siguiendo las indicaciones del fabricante, con un volumen final de 25 μ L que contenía: 5 μ L de ARN de la muestra, 0.625 μ L de cada cebador (0.5 μ M), 12.5 μ L de Buffer reaction, 1 μ L de One Step Rt-PCR enzyme y 5.25 μ L de agua grado biología molecular; con las siguientes condiciones de RT-PCR: PRRS Cebadores OUT: 30 min. a 50 °C y 2 min. a 94 °C, 40 ciclos (15 seg. a 94°C; 45 seg. a 53°C; 90 seg. a 68°C) y por último 5 min. a 68°C; y para PRRS Cebadores IN: 5 min. a 94 °C, 30 ciclos (30 seg. a 94°C; 30 seg. a 57°C; 60 seg. a 72°C), y por último 7 min. a 72°C. Se utilizó el equipo Veriti 96 well Thermal Cyclers, de Applied Biosystems (Life Technologies, Carlsbad, USA).

Cuadro 1. Cebadores PRRS OUT a utilizar para la amplificación de secuenciación (Jordan *et al.*, 2014)

Nombre	Secuencia	Posición AB811788 1256 pb
PRRS OUT 1 F	5'- GTACGGCGATAGGGACACC-3'	13416
PRRS OUT 2 R	5'- CCAGAATGTACTTGCGGCC-3	14672

Cuadro 2. Cebadores PRRS IN a utilizar para la amplificación de secuenciación (Andreyev *et al.*, 1997)

Nombre	Secuencia	Posición AB811788 716 pb
PRRS P420 F	5'- CCATTCTGTTGGCAATTTGA -3'	13731
PRRS P620 R	5'- GGCATATATCATCACTGGCG-3'	14440

Los productos de ADN amplificados de ambos PCR se corrieron en un gel de agarosa al 2% con las siguientes condiciones de electroforesis: 50 min, 90 voltios, 400 mA., y posteriormente se purificaron utilizando el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen), de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Qiagen, 2001).

Para la reacción de secuenciación se utilizó el kit Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing, de Applied Biosystems, con un volumen final de 20 μ L, que contenía: 11 μ L de agua grado biología molecular, 4 μ L de Ready Reaction Premix, 2 μ L de Sequencing buffer, 1 μ L del cebador y 2 μ L del amplicón purificado, midiendo previamente la absorbancia de este a 260nm en un espectrofotómetro (NanoDrop, Thermo Scientific), y siguiendo las especificaciones del fabricante del kit (Thermo Fisher Scientific, 2016), con las siguientes condiciones: 2 min. a 96 °C, 30 ciclos (10 seg. a 96°C; 5 segs. a 50°C; 4 min. a 60°C), en el equipo Veriti 96 well Thermal Cycler, de Applied Biosystems (Life Technologies, Carlsbad, USA).

Posteriormente se realiza la purificación con el Kit BigDye XTerminator Purification, de Applied Biosystems, con un volumen final que contenía: 5 μ L de producto del PCR de secuenciación, 22.5 μ L de solución de SAM y 5 μ L de XTerminator Solution, siguiendo las indicaciones del fabricante (Applied Biosystems, 2007). La secuenciación final de los productos se realizó en un secuenciador ABI3130 (Applied Biosystems).

Se realizó la lectura de las curvas cromatográficas, tanto de la secuencia directa como la reversa, mediante el software Sequencing Analysis 5.4 (Applied Biosystems) y posteriormente fueron ensambladas utilizando el software SeqScape 2.6 (Applied Biosystems).

Las secuencias obtenidas fueron alineadas, junto con un total de 35 secuencias descargadas del Genbank incluyendo una secuencia del virus PRRS1 utilizada como grupo externo, utilizando el programa Clustal Omega (Sievers et al., 2011).

Las secuencias alineadas fueron editadas con el programa Bioedit (Hall, 1999).

Posteriormente, se eliminaron las secuencias que mostraron un 100% de identidad en el algoritmo de distancia por parejas del programa MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013), y se utilizaron 24 secuencias para la construcción del árbol. Se utilizó la herramienta “Find the best model” incorporada en MEGA X (Kumar, 1980), para determinar cuál modelo de sustitución se ajustaba mejor a las secuencias seleccionadas para cada una de las cepas analizadas, y de acuerdo a esto, se aplicó el modelo de sustitución Jukes-Cantor (Jukes y Cantor, 1969), en concordancia con el Criterio de Información Akaike (AIC). Finalmente, se construyó el árbol filogenético, utilizando el método de distancia de Máxima verosimilitud, del programa MEGA X, con un bootstrap de 1000 repeticiones, y se utilizó como grupo externo una secuencia de PRRS 1 (KT159249, Belgium 2013).

3. Resultados

De las 18 muestras secuenciadas, solamente se obtuvieron 8 secuencias, correspondientes a muestras colectadas en cinco provincias de Costa Rica: San José, Alajuela, Cartago, Heredia y Puntarenas. Las 10 muestras restantes presentaron fragmentos muy cortos y de mala calidad, que no aportaban la información necesaria para realizar el análisis filogenético, por lo que no se incluyeron en el mismo. Para realizar el análisis filogenético, se utilizó como grupo externo la secuencia de PRRS1 KT159249, Belgium 2013 (raíz del árbol).

De acuerdo con lo que se observa en el árbol filogenético (Figura 1), realizado con el Programa MEGA X, las secuencias obtenidas en Costa Rica se agruparon en tres diferentes cluster. La muestra de Cartago comparte ancestros comunes con cepas de USA y una de Japón, mientras que, las de Heredia (Santa Bárbara) comparten ancestros comunes con una cepa de USA y con secuencias obtenidas en Europa, Asia y América.

Las muestras de San José, Alajuela y Puntarenas están más estrechamente emparentadas, ya que comparten ancestros comunes entre ellas, a pesar de la distancia geográfica que existe entre estas provincias. Por otra parte, la secuencia proveniente de Cartago, es la secuencia de Costa Rica más cercana a la especie de PRRS 1, por lo que parece ser la más ancestral de todas. Por el contrario, las muestras de Heredia presentan una mayor distancia genética con respecto al grupo externo, y al resto de secuencias de Costa Rica

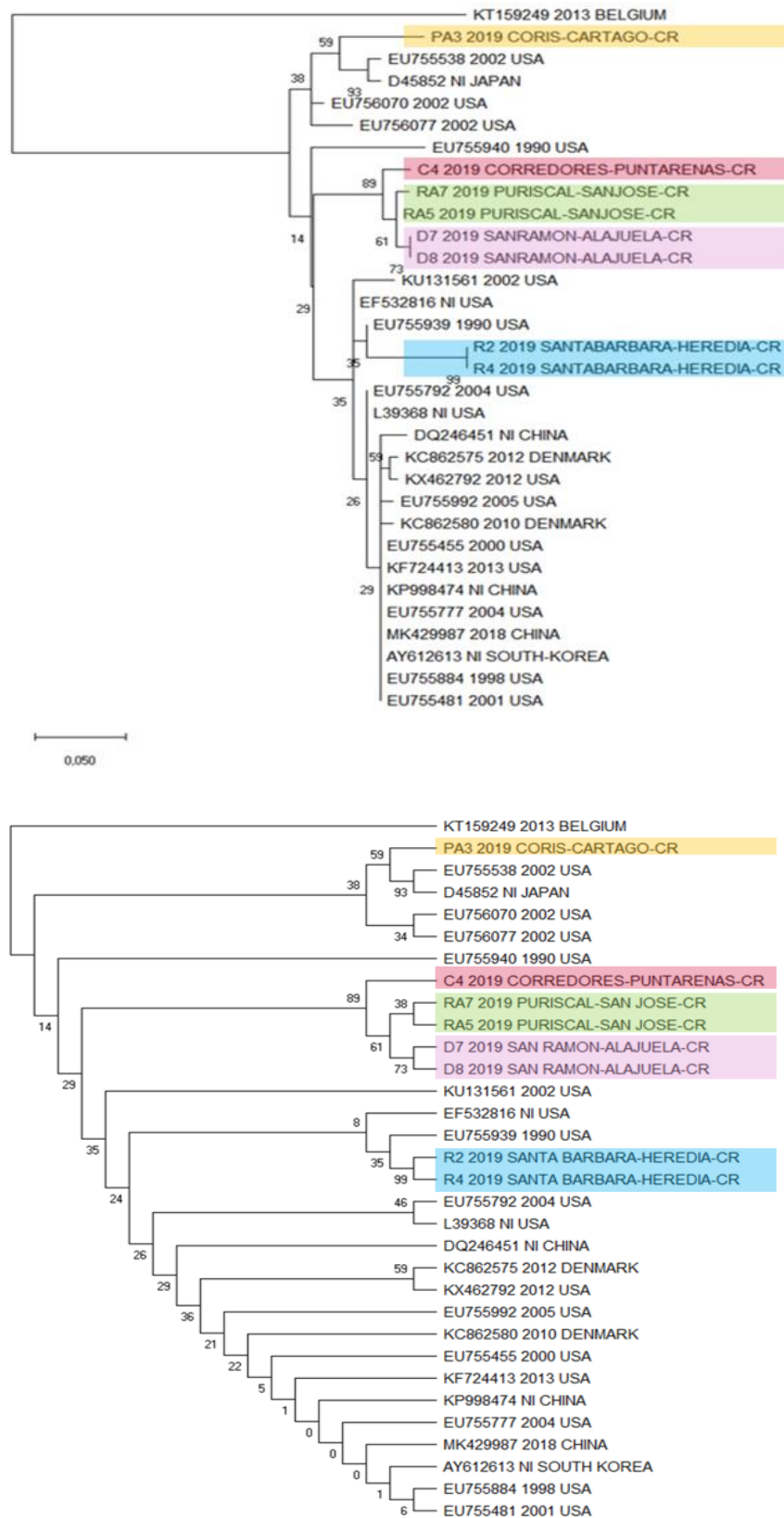


Figura 1. Árbol filogenético de la región ORF5 del PRRSV, en granjas de producción de Costa Rica. Análisis evolutivo por método de máxima verosimilitud y el modelo de Jukes-Cantor (Jukes y Cantor, 1969). Este análisis involucró 32 secuencias de nucleótidos. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA X (Kumar, 1980).

4. Discusión

De acuerdo a la información proporcionada en el árbol filogenético, se infiere que las cepas encontradas en las muestras de Costa Rica tienen su origen en cepas de USA. Estos resultados se pueden comparar con los obtenidos por Martínez-Bautista *et al.* (2018), donde se realizó un análisis filogenético de PRRSV 2, en México, y la mayoría de secuencias provienen de cepas aisladas en USA.

Al analizar la topología de las secuencias de Costa Rica, estas se encuentran distribuidas en tres diferentes cluster, lo que sugiere que el virus presenta tres diferentes orígenes y épocas de ingreso al país. En el caso de las muestras provenientes de Heredia, éstas presentan una mayor distancia genética con respecto al grupo externo, y al resto de secuencias de Costa Rica, lo que indica que son las más divergentes.

Por otra parte, de las muestras que se lograron secuenciar, se determinó que la cepa de Cartago está más distante filogenéticamente, en comparación con las otras cepas obtenidas en Costa Rica, pero más cercana al ancestro común (grupo externo), por lo que se puede afirmar que es la cepa más ancestral, o en otras palabras, fue la primera que ingresó al país. Esta granja fue diagnosticada positiva a PRRS en agosto de 1995, y desde 1990 hay registros de importaciones de pie de cría a esta granja, provenientes de USA y Canadá (comunicación personal Dr. Bernal León, datos no publicados).

Los primeros reportes de PRRS en el país están documentados por Bermúdez (1996), que realizó estudios de seroprevalencia en 15 granjas, y en dicho estudio se indica el ingreso de

nuevos animales positivos a PRRSV, como una alta probabilidad de contagio, ya que el país ha sido importador constante de animales de pie de cría, principalmente de USA.

Las secuencias provenientes de Puntarenas, San José y Alajuela, se observan más estrechamente emparentadas entre sí, a pesar de la distancia geográfica que existe entre estas provincias, lo que hace suponer que estas granjas pudieron compartir animales infectados con las mismas cepas del virus de PRRS. A diferencia de las cepas obtenidas en Cartago y Heredia, las cuales no están relacionadas con otras fincas o granjas.

De acuerdo con esta información, se puede afirmar que, la similitud genética entre los aislamientos no necesariamente es correlacionable con la distancia geográfica, ya que, como afirma Goldberg *et al* (2000), el movimiento de PRRSV hacia las granjas, no ocurre regularmente a través de procesos como vectores de viento o de vida silvestre, sino que es más común que el virus se mueva a través del transporte de animales o semen, o por medio de fómites.

Por esta razón, adquiere gran importancia la necesidad de implementar medidas de bioseguridad, así como implementar controles en las fronteras y mantener actualizado un libro de registro de ingresos de personas y vehículos (Monterubbiansesi, 2017).

5. Conclusiones

- Se determinó que el virus presenta tres diferentes orígenes y épocas de ingreso al país, y todas las muestras analizadas tienen su origen en cepas de USA.
- La cepa que proviene de Cartago es la más ancestral, ya que está más cerca del grupo externo, por lo que se puede afirmar que fue la primera cepa que ingresó al país.

- La cepa de Cartago está más distante filogenéticamente, en comparación con las otras muestras obtenidas en Costa Rica, pero más cercanas al ancestro común.
- Las muestras de Heredia son las más divergentes.
- La similitud genética entre los aislamientos no necesariamente es correlacionable con la distancia geográfica.

6. Recomendaciones

Debido a que el virus se mueve más fácilmente a través del transporte de animales y semen, o por medio de fómites, se recomienda implementar medidas de bioseguridad, como: uso de ropa exclusiva para la granja, restringir la visita de personas ajenas al establecimiento, mantener alejados los camiones y transportistas de las áreas donde se alojan los animales, y evitar el intercambio de cerdos y semen de origen desconocido.

Además se recomienda realizar controles en las fronteras y mantener actualizados los requisitos de importación para cada país, de acuerdo con la información científica disponible y los análisis de riesgo.

Por último, es importante mantener actualizado un libro de registro de ingresos de personas y vehículos, ya que esto facilitará la investigación epidemiológica en caso de ser necesario.

7. Referencias bibliográficas

- Adams, M. Lefkowitz, E. King, A. Harrach, B. Harrison, R. Knowles, N. Kropinski, A. Krupovic, M. Kuhn, J. Mushegian, A. Nibert, M. Sabanadzovic, S. Sanfaçon, H. Siddell, S. Simmonds, P. Varsani, A. Murilo, F. Gorbalenya, A. & Davison, A. 2017. Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2017). *Arch. Virol.* 162:2505–2538. doi:10.1007/s00705-017-3358-5.
- Andreyev, V.G. Wesley, R.D. Mengeling, W.L. Vorwald, A.C. & Lager, K.M. 1997. Genetic variation and phylogenetic relationships of 22 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) field strains based on sequence analysis of open reading frame 5. *Arch. Virol.* 142:993–1001. doi:10.1007/s007050050134.
- Applied Biosystems. 2011. MagMAX™ Pathogen RNA/DNA Kit Protocol (PN 4463379B).
- Bermúdez, Z. 1996. Estudio de Prevalencia de Anticuerpos a: Aujeszky, Peste Porcina Clásica, Gastroenteritis Transmisible, Coronavirus Respiratorio Porcino, Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino en cerdos de Costa Rica. Universidad Nacional. Costa Rica
- Biosystems, A. 2007. BigDye® XTerminator™ Purification Kit. Carlsbad, CA, USA.
- Collins, J. Benfield, D. Christianson, W. McCullough, S. Gorcyca, D. & Chladek, D. 1992. Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 4:117–126. doi:10.1177/104063879200400201.
- Flores-Mendoza, L. & Hernández, J. 2010. Vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): writing a history. *Vet. Méx.* 41:139–159.

- Goldberg, T.L. Hahn, E.C. Weigel, R.M. & Scherba, G. 2000. Genetic, geographical and temporal variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Illinois. *J. Gen. Virol.* 81:171–9.
- Hall, T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41:95–98. doi: citeulike-article-id:691774.
- Invitrogen Life Technologies. 2010. SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum®.
- Jukes, T. & Cantor, C. 1969. Evolution of protein molecules. Munro HN, Ed. *Mamm. Protein Metab.* 21–132.
- Kukielka, D. & Sánchez-Vizcaíno, J.M. 2008. Medidas de manejo del Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino (PRRS) basadas en su diagnóstico molecular. *Rev. Complut. Ciencias Vet.* 2:187–193.
- Kumar S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35:1547–1549. doi:10.1093/molbev/msy096
- Kvisgaard, L.K. Hjulsager, C.K. Fahnøe, U. Breum, S.T. Ait-Ali, T. & Larsen, L.E. 2013. A fast and robust method for full genome sequencing of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) Type 1 and Type 2. *J. Virol. Methods* 193:697–705. doi: 10.1016/j.jviromet.2013.07.019.
- López-Heydeck, S. Alonso, R. Mendieta, H. & Vásquez, J. 2015. Síndrome reproductivo y respiratorio del cerdo (PRRS). Revisión. *Rev. Mex. Ciencias Pecu.* 6, Núm.1:89.

- Martínez-Bautista NR, Sciutto-Conde E, Cervantes-Torres J. 2018. Phylogenetic analysis of ORF5 and ORF7 of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus and the frequency of wild-type PRRS virus in México. *Transbound Emerg Dis.* 2018;65:993–1008. <https://doi.org/10.1111/tbed.12831>
- Monterubbianesi, M. 2017. Mantener El País Libre de PRRS Es Tarea de Todos. <https://horizonteadigital.com/mantener-el-pais-libre-de-prrs-es-tarea-de-todos-vet-mariela-monterubbianesi/>.
- Murtaugh, M.P. Elam, M.R. & Kakach, L.T. 1995. Comparison of the structural protein coding sequences of the VR-2332 and Lelystad virus strains of the PRRS virus. *Arch. Virol.* 140:1451–60.
- Music, N. & Gagnon, C. 2010. The role of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus structural and non-structural proteins in virus pathogenesis. *Anim. Health Res. Rev.* 11:135–163. doi:10.1017/S1466252310000034.
- OIE. 2015. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome. OIE Terrestrial Manual 2015. 1-15
- Ostrowski, M. Galeota, J.A. Jar, A.M. Platt, K.B. & Osorio, F. 2002. Identification of Neutralizing and Nonneutralizing Epitopes in the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus GP5 Ectodomain. *J. Virol.* 72:4241–4250. doi:10.1128/JVI.76.9.4241–4250.2002.
- Plagemann, P.G. 2004. GP5 ectodomain epitope of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, strain Lelystad virus. *Virus Res.* 102.

- Qiagen. 2001. QIAquick Gel Extraction Kit Protocol.
- Rossow, K.D. 1998. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome. *Vet Pathol* 35:1–20.
- Scientific, T.F. 2016. BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit USER GUIDE. USA.
- Sievers F, Wilm, A. Dineen, D. Gibson, T. Karplus, K. Li, W. Lopez, R. McWilliam, H. Remmert, M. Söding, J. Thompson, J. & Higgins, D. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 7. doi:10.1038/msb.2011.75.
- Suárez, P. 1995. *Genética Molecular del Virus del Síndrome Reprodutor y respiratorio Porcino: Aspectos Evolutivos, Diagnósticos e Inmunógenos.* Universidad Complutense de Madrid
- Tamura, K. Stecher, G. Peterson, D. Filipinski, A. & Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30:2725–9. doi:10.1093/molbev/mst197.
- Wensvoort, G. Terpstra, C. Pol, J.M.A. Laak, E.A. Bloemraad, M. de Kluyver, E.P. Kragten, C. & Van Buiten, L. 1991. Mystery swine disease in the Netherlands: The isolation of Lelystad virus. *Vet. Q.* 13 (3):121–130. doi:10.1080/01652176.1991.9694296.
- Wesley, R.D. Mengeling, W.L. Lager, K.M. Clouser, D.F. Landgraf, J.G. & Frey, M.L. 1998. 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. Diagnostic Investig.* 10:140–144. doi:10.1177/104063879801000204.

Discusión general

En el Artículo I se describe un estudio de prevalencia del virus a nivel nacional, donde se puede apreciar una prevalencia general de animales positivos del 13,38% (171/1278), y en las granjas analizadas se obtuvo una prevalencia del 36% (9/25). De acuerdo a los estudios realizados anteriormente en Costa Rica, se observa que Bermúdez (1996) reportó una seroprevalencia entre el 1.3% y el 69.6% en 11 fincas de las 15 que fueron muestreadas en todo el territorio nacional; por su parte Ugalde (1998) obtuvo una seroprevalencia de 38.55%. En el 2001, Pineda-Sáenz reportó seroprevalencias en 3 fincas comerciales, con valores entre 2.7% y 92.28%, y hasta 25 variables antigénicas en una misma finca; y Castro-Mena (2006) arrojó valores entre 53.13% y 93.75% en diferentes edades. No se encontraron referencias de zonas geográficas en estos estudios, por lo que no es posible realizar comparaciones de este tipo.

Asimismo, en Colombia, Cruz *et al.* (2006), determinaron una seroprevalencia de 4,3% en explotaciones extensivas. En México Rovelo *et al.* (2010) reportaron una prevalencia de 39,4%, y entre las granjas varió de 0% a 100%, demostrando una gran variabilidad en los datos obtenidos. Esto es consistente con lo hallado en otros estudios de seroprevalencia, en áreas donde la infección es endémica. Como se puede observar, los valores reportados en los estudios realizados anteriormente, tanto en Costa Rica como en otros países, son sumamente variables, lo que dificulta la comparación si se toman en cuenta algunos factores que pueden influir en la dinámica del virus, tales como: bioseguridad, grado de tecnificación, manejo, programas sanitarios, condiciones ambientales, entre otros.

Otro aspecto a considerar es la distribución geográfica del virus, ya que, a pesar de que la mayoría de granjas de producción porcicultora se encuentra en la provincia de Alajuela (MEIC, 2015), la mayor prevalencia se encontró en Cartago (34,26%) y la menor en Guanacaste (0%). No obstante, la mayoría de las granjas positivas se concentran en la zona central del país, con mayor altitud y donde las temperaturas son más bajas, y alejadas de las costas. Según el Instituto Meteorológico Nacional (IMN, 2015), durante el segundo semestre del año 2015 las temperaturas más altas se presentaron en la provincia de Guanacaste (32,8°C – 35,8°C), y las más bajas en la provincia de Cartago (15,6°C - 24,8°C). De acuerdo al estudio de (Hermann *et al.*, 2007), donde se determinó la estabilidad del PRRSV transmitido por el aire en función de la temperatura y la humedad relativa, y se estableció que el virus en aerosol fue menos estable a 41°C y más estable 5°C. Por su parte, Jacobs *et al.* (2010) realizaron un estudio, donde determinaron que la vida media del PRRSV infeccioso, decrece notablemente conforme aumenta la temperatura (mediciones a 4, 10, 20 y 30°C). Esto lleva a concluir que puede ser de gran utilidad, realizar en el país investigaciones del PRRSV, relacionadas con factores climáticos como temperatura y humedad.

En cuanto a la edad de los cerdos, se determinó que la prevalencia más alta se encuentra en animales de 10 (18,98%) y 12 (23,05%) semanas de edad, y la más baja en cerdas de reemplazo (3,94%), lo que concuerda con lo reportado por Castro-Mena (2006), donde se observa que los cerdos de 6 semanas presentan un 0% de seropositividad, mientras que la mayor seroprevalencia se obtuvo en animales de 10 a 18 semanas. Por su parte Duinhof *et al* (2011), en un estudio enfocado a identificar el grupo etario más efectivo para detectar la circulación del virus en cerdos holandeses, donde se muestrearon animales de entre 8 y 22 semanas, se obtuvo la mayor prevalencia en cerdos de 9 a 16 semanas, con un rango que

varió de 0% a 100% entre hatos. Igualmente existe concordancia con lo reportado por Salinas *et al.* (2008) en México, donde se comparó la prevalencia en etapas de reproducción y de engorde, y reportaron valores de 56% en la etapa de producción y 14% en la etapa reproductiva.

Generalmente se reporta que los cerdos están sanos en el tiempo de destete, pero se ven afectados clínicamente de 3 a 4 semanas después, con la aparición de síntomas como: fiebre, anorexia, letargo, disnea, entre otros (Cuartero *et al.*, 2002). Dee *et al.* (1996) realizaron un estudio de seroprevalencia, en el cual reportaron que todos los cerdos analizados dentro de una semana después del destete, con edades entre 18 y 22 días, eran seronegativos, mientras que del 80 al 100 por ciento de los cerdos evaluados de ocho a nueve semanas, presentaban títulos de anticuerpos.

Cabe destacar que las cerdas de reemplazo presentaron los porcentajes más bajos de prevalencia en la mayoría de las granjas, lo cual coincide con estudios realizados por Klinge *et al.* (2009), en el cual se inocularon cerdos de diferentes edades con cepas de variada virulencia, y se evidenció que los lechones de tres semanas de vida tenían viremias significativamente más largas que los cerdos adultos, independientemente del aislado de PRRSV utilizado para la inoculación. Asimismo, los cerdos de dos meses tenían cargas víricas significativamente mayores en diferentes tejidos, comparados con los animales de seis meses, independientemente de la virulencia de la cepa utilizada en el desafío. Estos hallazgos muestran que la edad del animal influye en el resultado de la infección aguda por PRRSV, debido al aumento de la resistencia inmune innata, mientras que una respuesta de anticuerpos se desencadena a un umbral bajo de infección que es independiente de la edad. Las respuestas

de anticuerpos equivalentes se obtuvieron en respuesta a virus virulentos y atenuados, lo que indica que la masa antigénica necesaria para una respuesta inmunitaria se produce en un nivel bajo de infección y no se predice por el estado virémico. Por otra parte, para un adecuado control y prevención en la granja, se utilizan estrategias que permitan minimizar la circulación del virus dentro de la misma, y una de estas es la selección de cerdas sanas o previamente aisladas, aclimatadas y recuperadas, para pie de cría. Por lo tanto, van a ser eliminadas como reemplazos, las cerdas con problemas asociados a la enfermedad (Cho y Dee, 2006; Klinge *et al.*, 2009; Mendoza, 2015).

El presente estudio permitió establecer la prevalencia del PRRSV en los cerdos de producción de Costa Rica, además que se logró identificar la especie circulante en el país (PRRS 2). Conjuntamente, con los datos aportados, fue posible determinar la población etaria y las posibles zonas geográficas con mayor riesgo de contagio. Lo anterior permite focalizar las medidas preventivas, promover el uso de diferentes métodos diagnósticos y establecer medidas de bioseguridad que permitan un control y manejo adecuado en las granjas.

En el caso del Artículo II, que tenía por objetivo identificar algunas cepas que están circulando en Costa Rica, se lograron obtener 8 secuencias diferentes, provenientes de 5 provincias: Heredia, Cartago, Puntarenas, San José y Alajuela.

De acuerdo a la información proporcionada en el árbol filogenético, se infiere que las cepas encontradas en las muestras de Costa Rica tienen su origen en cepas de USA. Los primeros reportes de PRRS en el país están documentados por Bermúdez (1996), que realizó estudios de seroprevalencia en 15 granjas, y en dicho estudio se indica el ingreso de nuevos

animales positivos a PRRSV, como una alta probabilidad de contagio, ya que el país ha sido importador constante de animales de pie de cría, principalmente de EEUU.

Al analizar la topología de las secuencias de Costa Rica, estas se encuentran distribuidas en tres diferentes cluster, por lo que se puede concluir que el virus presenta tres diferentes orígenes y épocas de ingreso al país. Cabe destacar que, de las muestras que se lograron secuenciar, la que proviene de Cartago es la más ancestral, en otras palabras, de las muestras secuenciadas es la más antigua, se puede afirmar que fue la primera cepa que ingresó al país. Esta granja fue diagnosticada positiva a PRRS en agosto de 1995, y desde 1990 hay registros de importaciones de pie de cría a esta granja, provenientes de USA y Canadá (comunicación personal Bernal León, datos no publicados).

Las secuencias provenientes de Puntarenas, San José y Alajuela, se observan más estrechamente emparentadas entre sí, a pesar de la distancia geográfica que existe entre estas provincias, lo que hace suponer que estas granjas pudieron compartir animales infectados con las mismas cepas del virus de PRRS. A diferencia de las cepas obtenidas en Cartago y Santa Bárbara, las cuales no están relacionadas con otras fincas o granjas.

Finalmente, se puede concluir que las muestras de Cartago están más distantes filogenéticamente en comparación con las otras muestras obtenidas en Costa Rica pero más cercanas al ancestro común.

De acuerdo con esta información, se puede afirmar que, la similitud genética entre los aislamientos no necesariamente es correlacionable con la distancia geográfica, ya que, como afirman Goldberg *et al* (2000), el movimiento de PRRSV hacia las granjas, no ocurre

regularmente a través de procesos como vectores de viento o de vida silvestre, sino que es más común que el virus se mueva a través del transporte de animales o semen, o por medio de fomites.

Por esta razón, adquiere gran importancia la necesidad de implementar medidas de bioseguridad, como uso de ropa exclusiva para la granja, restringir la visita de personas ajenas al establecimiento, mantener alejados los camiones y transportistas de las áreas donde se alojan los animales, y evitar el intercambio de cerdos y semen de origen desconocido. Así como implementar controles en las fronteras y mantener actualizados los requisitos de importación para cada país de acuerdo con la información científica disponible y los análisis de riesgo. Por último, se recomienda mantener actualizado un libro de registro de ingresos de personas y vehículos, ya que esto facilitará la investigación epidemiológica en caso de ser necesario (Monterubbianesi, 2017).

Conclusiones Generales

- La prevalencia obtenida en este estudio aporta información nueva para la toma de decisiones en el país, ya que únicamente existen datos basados en análisis serológicos.
- En el país solamente circulan cepas de la especie PRRS 2.
- Cartago es la provincia con mayor prevalencia de PRRS (34,26%), y Guanacaste presenta la menor (0%).
- El PRRSV es más prevalente en zonas con temperatura más baja (Cartago), que en zonas con altas temperaturas (Guanacaste).
- En cuanto a la edad de los cerdos, la prevalencia más alta se presenta en animales de 10 (18,98%) y 12 (23,05%) semanas de edad, y la más baja en cerdas de reemplazo (3,94%).
- De acuerdo a la topología mostrada en el árbol filogenético, se puede concluir que el virus presenta tres diferentes orígenes y épocas de ingreso al país.
- La cepa que proviene de Cartago es la más ancestral, ya que está más cerca del grupo externo, por lo que se puede afirmar que fue la primera cepa que ingresó al país.
- La cepa de Cartago está más distante filogenéticamente, en comparación con las otras muestras obtenidas en Costa Rica, pero más cercanas al ancestro común.
- La similitud genética entre los aislamientos no necesariamente es correlacionable con la distancia geográfica.

Recomendaciones generales:

- Realizar en el país investigaciones del PRRSV, relacionadas con factores climáticos como temperatura y humedad.
- Utilizar la información presentada en este estudio sobre la edad más prevalente, cuando se requiera realizar un muestreo del virus durante un brote o dirigido a determinar presencia/ausencia de la enfermedad.
- Para un adecuado control y prevención en las granjas, se recomienda la selección de cerdas sanas o previamente aisladas, aclimatadas y recuperadas, para pie de cría.
- Implementar medidas de bioseguridad, como uso de ropa exclusiva para la granja, restricción de visitas ajenas al establecimiento, mantener alejados los camiones y transportistas de las áreas donde se alojan los animales, y evitar el intercambio de cerdos y semen de origen desconocido.
- Implementar controles en las fronteras y mantener actualizados los requisitos de importación para cada país de acuerdo con la información científica disponible y los análisis de riesgo.
- Registrar en las granjas el ingreso de personas y vehículos, ya que esto facilitará la investigación epidemiológica en caso de ser necesario.

Anexos

Anexo 1. Hoja de campo utilizada durante el muestreo

PROYECTO PRRS COSTA RICA

FECHA: _____ GRANJA PORCINA: _____

PROPIETARIO: _____

LOCALIZACIÓN:

TIPO DE GRANJA: CICLO COMPLETO _____ ENGORDE _____

INFORMACIÓN DE LA GRANJA: ESCRITA _____ AUTOMATIZADA _____

TAMAÑO DE LA GRANJA:

CERDAS _____ REEMPLAZOS _____ PRODUCCIÓN _____

MUESTRAS COLECTADAS:

LECHONES DE 8 SEMANAS: _____

LECHONES DE 10 SEMANAS: _____

LECHONES DE 12 SEMANAS: _____

REEMPLAZOS: _____ EDADES: _____

HORA DE COLECCIÓN: _____

COLECTADO POR: _____

DE REGISTRO EN LABORATORIO: _____

INFORMACIÓN ADICIONAL:

Anexo 2. Consentimiento informado

Universidad Nacional

Escuela de Medicina Veterinaria

Proyecto: Caracterización, epidemiología e inmunoprofilaxis del Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS) en Costa Rica.

Fecha: _____ Productor: _____

Dirección: _____

Nº Teléfono para contacto: _____ e-mail: _____

Información básica para el productor

El síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS), es producido por un Arterivirus, del cual se han reconocido dos genotipos: el europeo (virus Lelystad) y el Norte Americano (VR2332). Los signos clínicos de la enfermedad son pérdida del apetito, fiebre, enfermedad respiratoria, y una coloración azulada de las orejas, pérdida de la producción de leche y abortos. También se puede presentar partos tempranos, natimuecos y momias. Muchos de los cerdos que nacen de madres infectadas mueren en la primera semana post parto. La transmisión se da por contacto directo y sexual así como por aerosoles. En Costa Rica se han realizado varios estudios que demuestran una amplia distribución de este virus en las granjas porcinas de nuestro país.

Los objetivos que persigue este estudio son: 1) Caracterizar y establecer la epidemiología del virus del PRRS en Costa Rica para implementar estrategias de inmunoprofilaxis. Esto se logrará mediante la investigación de: a) Caracterizar el genotipo (Europeo, Americano o ambos) de Virus de PRRS presente en piaras de Costa Rica; b) Evaluar el nivel de protección de las vacunas que ofrece el mercado frente al genotipo identificado; c) Relacionar las cepas caracterizadas por anticuerpos monoclonales con las tipificaciones por otros métodos moleculares (PRC en tiempo real, RFLP y secuenciación); d) Identificar los factores de riesgo para PRRS; y e) Correlacionar la prevalencia de PRRS con los parámetros productivos y reproductivos de cada granja.

Como parte de la metodología, en la primera etapa se colectarán 200 muestras de cerdos con alta probabilidad de ser positivos a PRRS para identificar el genotipo circulante mediante pruebas de laboratorio altamente especializadas. En la segunda etapa se muestrearán 1000 cerdos de granjas de más de 200 vientres estratificados por tamaño. La cantidad de muestras a tomar por granja varía entre 40 y 70. Dentro de cada granja se muestrearán animales de 8, 10 y 12 semanas, así como reemplazos entre los 6 y 8 meses de edad, además del pie de cría (25% cada estrato). Los sueros serán analizados mediante las pruebas de laboratorio que garanticen obtener el resultado más exacto de la condición de infección del cerdo.

Para el logro de esos objetivos, es importante utilizar los registros productivos de la granja, de modo que se pueda determinar si, en las condiciones actuales, ha habido un efecto negativo del PRRS en la granja.

Este proyecto es un esfuerzo conjunto de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional, la Universidad de Utrecht en Holanda, el Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA) del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) y de la Empresa Farivet.

Consentimiento informado

Por este medio, una vez que se me han explicado los objetivos y alcances del estudio, de los investigadores a cargo, de mi rol dentro de la investigación así como de las responsabilidades y derechos que me asisten una vez iniciado el proyecto "Caracterización, epidemiología e inmunoprofilaxis del Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS) en Costa Rica", asiento que deseo participar de forma libre y voluntaria en él.

Como aspectos relevantes que he sido informado reconozco:

Mi granja y mis cerdos forman parte de una investigación científica para conocer la epidemiología del virus PRRS en Costa Rica.	Sí ____ No ____
Algunos de los cerdos de mi granja serán estudiados, para lo cual se les tomará una muestra de sangre. Los investigadores se comprometen a tomar la muestra siguiendo la técnica correcta para evitar infecciones, así como para proteger el bienestar de los animales.	Sí ____ No ____
Los registros de mi granja serán utilizados para la investigación. Los investigadores se comprometen a utilizar mis datos con la más alta discreción y seriedad, y con el compromiso de que terceros con conocerán del detalle de mi información.	Sí ____ No ____
Los investigadores se comprometen a realizar la investigación sin que yo tenga de pagar algún dinero por las muestras a procesar, y se comprometen a entregarme los resultados de los estudios.	Sí ____ No ____
Se me ha informado que, si lo deseo, puedo estar presente en el momento en que los animales son muestreados para vigilar el cumplimiento del correcto protocolo de sangrado y manejo de la muestra.	Sí ____ No ____
Me han indicado que, en el momento que lo desee, y sin que medie explicación alguna, me puedo retirar del estudio.	Sí ____ No ____

Habiendo sido informado en extenso sobre el proyecto, firmo dando mi aval

Nombre del productor

Firma

Número de cédula

Nombre de testigo

Firma

Número de cédula

Nombre de testigo

Firma

Número de cédula