# Estrategias de diagnóstico y control frente a HP-PRRSV

- Sánchez Carvaja JMI¹, Rodríguez Gómez IM¹, Ruedas Torres I¹, Barranco I¹, Carrasco L¹, Pallarés FJ² y
  Gómez Laguna J¹
  - <sup>1</sup> Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba, España.
  - <sup>2</sup> Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia, España.

En este último artículo propondremos las bases para realizar el diagnóstico ante la sospecha de estar frente a un brote del síndrome reproductivo y respiratorio porcino producido por cepas altamente patógenas (HP-PRRSv), así como las medidas de control y bioseguridad de interés para intentar reducir el impacto de estos brotes en nuestra explotación.

Las características clínicas y lesionales asociadas a los brotes por cepas HP-PRRSv (descritas en los dos números anteriores) permiten enmarcarlos dentro de las enfermedades sistémicas del cerdo (procesos que afectan a varios sistemas o aparatos orgánicos) de tipo hemorrágico. En este sentido, el diagnóstico diferencial basado en las lesiones macroscópicas incluye las siguientes enfermedades: peste porcina africana (PPA), peste porcina clásica (PPC), el síndrome dermatitis-nefropatía porcino (SDNP) y procesos septicémicos, especialmente los asociados a salmonelosis. Las lesiones más relevantes para realizar el diagnóstico diferencial se resumen en la *Tabla 1*.

Tabla 1. Diagnóstico diferencial de HP-PRRSV en base a las lesiones macroscópicas.

	HP-PRRSV	PPA	PPC	SDNP	Salmonelosis septicémica
Pulmón	Neumonía inters- ticial Bronconeumonía (infecciones bac- terianas secun- darias)	Marcado edema alveolar e inters- ticial	-	-	Bronconeumonía
Nódulos linfá- ticos	Necrosis y hemo- rragias	Hemorrágicos	-	-	Linfadenopatía y hemorragias
Piel	Cianosis y hemo- rragias	Cianosis y hemo- rragias	Eritema	Máculas y pápulas color rojizo /vio- láceo	Cianosis
Bazo	-	Esplenomegalia hiperémica	Múltiples infartos en el margen	-	Esplenomegalia
Riñón	Hemorragias pete- quiales Nefritis intersticial	Hemorragias pete- quiales	Hemorragias pete- quiales	Glomerulonefritis y hemorragias pete- quiales	Hemorragias pete- quiales
Tonsila	Tumefacción y/o hemorragias	-	Áreas de necrosis	-	-
Intestino	-	Hemorragias petequiales	Botones ulcero- sos/pestosos	-	Enterocolitis ne- crótico-fibrinosa
Vesícula biliar	-	Edema en la pared	Hemorragias pete- quiales	-	-
Otros	Cuadro septicé- mico Atrofia tímica	Hidrotórax Hidropericardio Ascitis	Sintomatología nerviosa Malformaciones congénitas Trombocitopenia	-	Sintomatología nerviosa Focos de necrosis en el hígado

HP-PRRSv: Síndrome reproductivo y respiratorio porcino altamente patógeno; PPA: Peste porcina africana; PPC: Peste porcina clásica; SNDP: Síndrome dermatitis-nefropatía porcino.









Figura 1. Lesiones asociadas a PPA. (a) Bazo aumentado de tamaño y de color muy oscuro (esplenomegalia hiperémica). (b) Nódulos linfáticos hemorrágicos. (c) Múltiples hemorragias en la corteza y la pelvis renal. (d) Edema en la pared de la vesícula biliar.

### **PESTE PORCINA AFRICANA**

La peste porcina africana (PPA) es una enfermedad vírica de carácter hemorrágico y altamente contagiosa que afecta exclusivamente al ganado porcino, tanto doméstico como silvestre y está causada por un virus ADN del género *Asfivirus* (*Dixon et al., 2005; 2013*). En el último año, la PPA ha recobrado una gran relevancia a nivel mundial, describiéndose brotes tanto en China como en Europa, donde la enfermedad se ha extendido por varios países del este como Letonia, Lituania, Estonia, Polonia y la República Checa. Finalmente, la PPA ha alcanzado el sur de Bélgica donde se han descrito recientemente los primeros casos en jabalíes (*OIE, 2018*).

La PPA puede presentar diferentes cursos clínicos y un amplio espectro de lesiones macroscópicas, que pueden variar desde una intensa diátesis hemorrágica en las formas agudas de la enfermedad hasta lesiones mínimas en las formas crónicas que suelen aparecer alteradas por infecciones bacterianas secundarias.

Las formas agudas de la enfermedad son las más frecuentes y las que principalmente tendremos que tener en cuenta de cara al diagnóstico diferencial con formas altamente virulentas del PRRSV. Estas formas están inducidas por cepas de alta y moderada virulencia y se caracteriza por una fiebre intensa (40,5 - 42°C) que hace que los animales tiendan a permanecer juntos, anorexia, muertes súbitas con presencia de espuma sanguinolenta en los ollares y abortos (Colgrove et al., 1969; Pan y Hess, 1984; Sierra et al., 1990; Gómez-Villamandos et al., 1995a; Carrasco et al., 1996a, 1996b, 2002; Sánchez-Vizcaíno y Arias, 2012). En la piel de las orejas, las extremidades y el abdomen aparecen lesiones vasculares manifiestas que varían entre hiperemia y cianosis, hemorragias e incluso áreas de necrosis (Moulton y Coggins, 1968; Mebus y Dardiri, 1979; Gómez-Villamandos et al., 2013). Las lesiones más características son una esplenomegalia hiperémica muy intensa (Figura 1a), en la cual el bazo puede alcanzar hasta cuatro veces su tamaño y presenta color oscuro y consistencia friable, lesiones hemorrágicas en diferentes órganos como riñón (*Figura 1b*), nódulos linfáticos (*Figura 1c*), epicardio y endocardio, así como un intenso edema a nivel alveolar e intersticial en el pulmón y en la pared de la vesícula biliar (*Figura 1d*). También podemos encontrar hidrotórax, hidropericardio o ascitis (*Mebus y Dardiri, 1979; Gómez-Villamandos et al., 1995a; Hervas et al., 1996; Carrasco et al., 1997a, b; Sánchez-Vizcaíno y Arias, 2012*). Aunque para poder llevar a cabo un diagnóstico diferencial en cualquiera de estos casos será necesario apoyarse en el diagnóstico laboratorial, la presencia de una intensa esplenomegalia hiperémica tan característica de la PPA nos permitirá sospechar que se trata de un cuadro ocasionado por este virus y no por cepas HP-PRRSV.

## PESTE PORCINA CLÁSICA

La peste porcina clásica (PPC), también conocida como "cólera porcino", está causada por un virus ARN perteneciente a la familia Flaviviridae, género Pestivirus, del que existen cepas de distinta virulencia (Van Regenmortel et al., 2000). Así, la PPC presenta varias formas clínicas (hiperaguda, aguda, crónica y congénita) en función de la virulencia de la cepa, la susceptibilidad de los animales y el tiempo de infección (Trautwein, 1988). Independientemente del curso de la enfermedad, la sintomatología clínica se caracteriza por anorexia, letargia, fiebre y sintomatología nerviosa en la que destaca la marcha ondulante, parálisis del tercio posterior (paso de ganso) y movimientos natatorios. A nivel cutáneo, aparecen lesiones eritematosas que se vuelven cianóticas en la punta de las orejas, el abdomen y las extremidades. Además, estos síntomas suelen acompañarse de conjuntivitis, postración, descarga nasal, tos y disnea. Las lesiones macroscópicas más relevantes se corresponden con una diátesis hemorrágica caracterizada por hemorragias petequiales en el riñón, vejiga urinaria, laringe (Figura 2a) y nódulos linfáticos (Cheville y Men-

Figura 2. Lesiones asociadas a PPC. (a) Hemorragias petequiales en la superficie de la laringe. (b) Infartos de forma triangular en el borde del bazo. (c) Áreas de necrosis en la tonsila. (d) Meningoencefalitis no purulenta. (e) Parálisis del tercio posterior, pata de ganso.



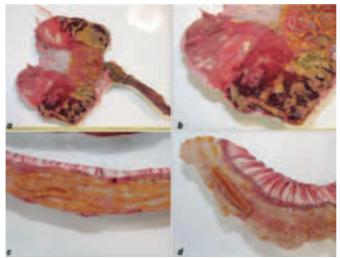


Figura 3. Lesiones asociadas a Salmonela septicémica. (a-b) Gastritis fibrinohemorrágica e (c-d) ileotiflocolitis difteroide, caracterizadas por el engrosamiento de la mucosa y la presencia de erosiones y úlceras coalescentes cubiertas por una membrana amarillenta fibrinonecrótica (enteritis fibrinosa de tipo difteroide).

geling, 1969; Trautwein, 1988; Van Oirschot, 1999; Potier et al., 2006). Por otro lado, lesiones como infartos multifocales de forma triangular que hacen relieve en la periferia del bazo (Figura 2b), áreas necróticas en la tonsila (Figura 2c), así como, la presencia de enteritis difteroide focal, botones ulcerosos o pestosos en el intestino delgado (íleon y válvula ileocecal, principalmente) y grueso (ciego y colon) son características de animales infectados con PPC (Cheville y Mengeling, 1969; Trautwein, 1988; Van Oirschot, 1999; Potier et al., 2006) y que nos ayudarán a diferenciar entre este proceso patológico y un brote de HP-PRRSV.

# SALMONELOSIS SEPTICÉMICA

La salmonelosis porcina causada por Salmonella Choleraesuis puede asociarse tanto al desarrollo de cuadros septicémicos como a procesos entéricos (Baskerville y Dow, 1973). Los cuadros septicémicos pueden aparecer a cualquier edad, siendo más frecuentes en cerdos destetados y hasta los 80 kg de peso. Los animales afectados suelen presentar inapetencia, letargia, fiebre (40,5-41,5°C), tos, disnea, incoordinación, parálisis y convulsiones. Al tercer o cuarto día posterior a la infección los animales desarrollan una diarrea acuosa o amarillenta (Griffith et al., 2006). En la necropsia, las lesiones macroscópicas más características son áreas hiperémicas o cianóticas en la piel de las orejas, el abdomen y las extremidades, bronconeumonía, esplenomegalia, hepatomegalia (en ocasiones acompañada de focos de necrosis) y hemorragias en el riñón y los nódulos linfáticos que pueden aparecer aumentados de tamaño (Griffith et al., 2006). En el intestino, las lesiones variarán en función de la duración de la enfermedad, desde una congestión de la mucosa hasta el desarrollo de una enteritis fibrinosa de tipo difteroide que afecta al íleon, colon y ciego principalmente (Figura 3). En la mayoría de los brotes, los cuales están asociados a factores estresantes, presentan una tasa de morbilidad baja (<10%) con una elevada tasa de mortalidad (Griffith et al., 2006). La principal diferencia entre la salmonelosis septicémica y los brotes de HP-PRRSV



Figura 4. Lesiones asociadas a SNDP. (a) Máculas y pápulas de color rojizo o violáceo que afectan a la región de la espalda, cuello y orejas. (b) Glomerulonefritis necrótico-fibrinosa que afecta al riñón.

será la presencia de enterocolitis fibrinosa de tipo difteroide, así como, en algunos casos, focos miliares de necrosis a nivel hepático.

# SÍNDROME DERMATITIS-NEFROPATÍA PORCINO

El síndrome dermatitis-nefropatía porcino (SDNP) es un síndrome hemorrágico asociado tradicionalmente a la infección con Circovirus porcino tipo 2 (PCV2) (Rosell et al., 2000; Segalés et al., 2006). Recientemente, el SDNP se ha descrito en cerdas que murieron con sintomatología aguda y fallo reproductivo, detectando altos niveles de Circovirus porcino tipo 3 (PCV3) en los fetos abortados (Palinski et al., 2016). No obstante, a día de hoy no está claro que este síndrome tenga un origen infeccioso ya que se ha diagnosticado en muchos animales en los que no ha sido posible detectar la presencia de PCV2, PCV3 o incluso otros patógenos. El SNDP se corresponde con una vasculitis necrotizante

sistémica consecuencia de un proceso inmunomediado. A nivel cutáneo provoca la aparición de áreas circulares o irregulares de color rojizo o violáceo (maculas y pápulas) por toda la superficie corporal (Figura 4a), siendo más intensas en la zona del abdomen, periné y cuartos traseros. Posteriormente estas lesiones evolucionan formando costras de colores oscuros que acaban desapareciendo a las 2-3 semanas. Los animales que mueren consecuencia del SDNP presentan lesiones multifocales de color rojizo en ambos riñones (lesión bilateral) (Figura 4b), a pesar de que parecen hemorragias, se trata de una glomerulonefritis membranoproliferativa (Segalés et al., 2006). Las lesiones a nivel de cutáneo y renal recuerdan a las provocada por cepas HP-PRRSV, sin embargo, la ausencia de otras lesiones a nivel de pulmón, tonsila o nódulos linfáticos nos permitiría diferenciar a priori fácilmente entre ambos procesos.

Considerando las similitudes a nivel clínico y lesional entre el HP-PRRSV y otras enfermedades sistémicas del cerdo

Tabla 2. Pruebas de diagnóstico y muestras para confirmar un brote de PRRSV.

Prueba	Muestras y conservación	Detección (días post-infección)	
IHQ / ISH	Tejidos: pulmón, tonsila, nódulos linfá- ticos, timo Tejidos procesados y fijados en formol al 10% durante 18-24h (nunca más de 24h)	4 – 15 días se observan mejor las células posi- tivas	
Aislamiento del virus	Tejidos, fluido oral y suero refrigerados (4°C)	De 1 a 30 días en suero y tejidos 30 – 90 días en tonsila y suero > 90 días en tonsila	
RT-PCR	Hisopos nasales, lavado broncoalveo- lar, fluido oral, tejidos, cordón umbilical, semen y suero. Muestras refrigeradas a 4°C	De 1 a 30 días en suero, tejidos y fluido oral 30 – 90 días en suero, fluido oral y tonsila > 90 días en tonsila	
ELISA	Fluido oral y suero refrigerados (4°C)	De 7 – 14 días hasta 4 meses – 1,5 años	

IHQ: inmunohistoquímica; ISH: hibridación in situ; RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa; ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.

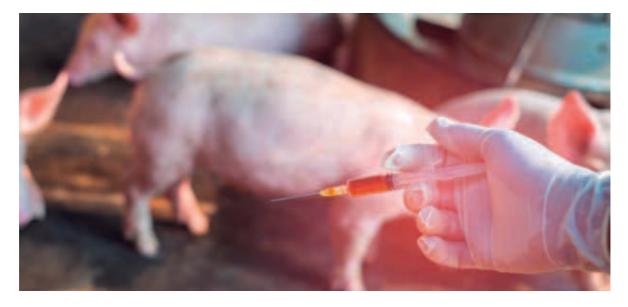
(a) descritas anteriormente, el diagnóstico laboratorial resulta fundamental para alcanzar un diagnóstico preciso ante un brote por cepas virulentas del PRRSV.

### DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

El diagnóstico laboratorial del PRRSV se ha basado tradicionalmente en el empleo tanto de (I) herramientas de diagnóstico directo, entre las que podemos contar con el aislamiento del virus, técnicas de inmunohistoquímica o hibridación in situ, o técnicas de biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR, del inglés Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction), así como de (II) herramientas de diagnóstico indirecto como métodos serológicos basados en ELISA (del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay: "ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas") para evaluar la seroconversión de los animales infectados (Mengeling y Lager, 2000). A estas técnicas hay que sumarle el uso cada vez más extendido de la secuenciación, la cual nos permite identificar de manera mucho más específica qué cepa del PRRSV está circulando en un brote en estudio, así como realizar estudios epidemiológicos sobre evolución y dispersión de las cepas (Cortey et al., 2017). Aunque estas técnicas llevan a cabo un diagnóstico preciso de la infección por el PRRSV, será fundamental completar los resultados laboratoriales con la historia clínica de la explotación teniendo en cuenta entre otros aspectos el programa vacunal de la granja en cuestión, ya que el uso extendido de vacunas vivas atenuadas y la ausencia de técnicas DIVA (del inglés Differentiating Infected from Vaccinated Animal), que permitan diferenciar a los animales vacunados de los infectados por el virus de campo, nos pueden conducir a un diagnóstico equivocado. Teniendo en cuenta la variabilidad entre cepas del PRRSV así como la aparición de nuevas cepas con una elevada virulencia en los últimos años se está trabajando en el desarrollo de nuevas herramientas diagnósticas que permitan no sólo diferenciar de forma eficaz entre cepas clásicas del PRRSV y cepas HP-PRRSV facilitando el diagnóstico en situaciones donde coexisten ambas cepas; sino también que aporten una respuesta rápida y precisa ante este tipo de brotes caracterizados por su elevada contagiosidad y capacidad de dispersión (*Zhou y Yang, 2010*).

Con el fin de solventar estos contratiempos y obtener diagnósticos más precisos en un menor tiempo, se han desarrollado ensayos de RT-PCR a tiempo real que permitan diferenciar entre cepas clásicas del PRRSV y cepas HP-PRRSV (Kleiboeker et al., 2005; Lurchachaiwong et al., 2008; Xiao et al., 2008; Wernike et al., 2012; Chai et al., 2013; Yang et al., 2017). Actualmente estas nuevas técnicas de RT-PCR están siendo utilizadas casi exclusivamente en el sureste asiático, principalmente en China, donde a través de distintas aproximaciones como técnicas one-step RT-PCR, se detectan deleciones en la secuencia de aminoácidos en la región que codifica la proteína Nsp2 (del inglés nonstructural protein), región que presenta normalmente deleciones en las cepas HP-PRRSV. Además, se han desarrollado técnicas de PCR múltiple que permiten diferenciar entre virus que provocan enfermedades sistémicas en el cerdo como la PPA, la PPC o la Enfermedad de Aujeszky (Hu et al., 2015). De especial interés es la descripción de una prueba inmunocromatográfica que permitiría detectar cepas clásicas y HP-PRRSV, ya que posibilitaría hacer el diagnóstico directamente en granja por el veterinario de campo facilitando la inmediata adopción de medidas de control (Li et al., 2011).

Por otro lado, las pruebas ELISA para detectar anticuerpos en suero son útiles para confirmar la presencia del PRRSV en una granja, sin embargo, su valor diagnóstico es limitado a nivel individual debido a que el virus es ubicuo en la gran mayoría de las granjas porcinas. Igualmente, como se ha comentado con anterioridad, se podría generar



confusión en el diagnóstico debido a vacunaciones previas y a la presencia de anticuerpos maternales (*Zimmerman et al., 2012*). Actualmente, la prueba estándar para detectar anticuerpos frente a las proteínas de la nucleocápside tanto de cepas clásicas como de cepas HP-PRRSV es un ELISA comercial (*IDEXX PRRS X3 ELISA*, IDEXX Laboratories Inc.). Sin embargo, se han descrito experimentalmente dos antígenos Nsp2-180 (conservado en cepas clásicas y HP-PRRSV) y Nsp2-D29 (región delecionada en cepas HP-PRRSV) que utilizados en un ELISA indirecto diferencian entre anticuerpos IgG reactivos frente a cepas clásicas y cepas HP-PRRSV. De esta forma, los cerdos infectados con una cepa HP-PRSV serían positivos a Nsp2-180 y negativos a Nsp2-D29 (*Xiao et al., 2014*).

Ante el desarrollo de estas nuevas técnicas de diagnóstico frente a cepas HP-PRRSV hay que tener en cuenta que, si bien la deleción en la Nsp2 es frecuente en estas cepas, hay también una elevada variabilidad entre estas cepas de forma que las deleciones presentadas no son idénticas entre ellas, por lo que podrían conducir a un diagnóstico erróneo. De esta forma, un diagnóstico positivo sí que nos podría estar identificando un brote por este tipo de cepas, pero ante un diagnóstico negativo no podríamos estar cien por cien seguros de que no se trate de cepas virulentas del PRRS y tendríamos que recurrir a otras herramientas como la secuenciación.

# ESTRATEGIAS PARA EL CONTROL DE HP-PRRSV

#### Vacunación

Las vacunas actuales frente al PRRSV disponibles a nivel mundial no proporcionan una protección universal y completa como consecuencia de la gran diversidad genética del virus y de su capacidad para modular y escapar de la respuesta inmune del cerdo. A pesar de ello, estas vacunas son muy útiles reduciendo el impacto de la enfermedad en la granja (Zimmerman et al., 2012). En el mercado existen actualmente tanto vacunas vivas modificadas (MLV) como vacunas inactivadas, las cuales se suelen utilizar en combinación con MLVs mejorando su efectividad. La gran ventaja de las MLVs es que inducen una respuesta inmune más eficaz en comparación con las vacunas inactivadas proporcionando protección homóloga, sin embargo, la protección cruzada entre estas vacunas y las cepas de campo no parece ser suficiente para prevenir la enfermedad (Zimmerman et al., 2012). El desarrollo de una vacuna universal frente al PRRSV es uno de los grandes retos a los que se enfrenta la comunidad científica en la actualidad, superando así las limitaciones de las vacunas actuales.

En China, tras la aparición en 2006 de los brotes de HP-PRRSV y su posterior expansión por gran parte del país (*Zhou y Yang, 2010*), comenzaron a utilizarse vacunas con cepas HP-PRRSV atenuadas (JXA1-R, HuN4-F112 y TJM-92)

que proporcionaron protección homóloga, siendo registradas y utilizadas comercialmente (Tian et al., 2009; Leng et al., 2012; Yu et al., 2015; Wang et al., 2016). Además, también se ha descrito una protección heteróloga parcial mediante el uso de vacunas atenuadas del PRRSV-1 (Roca et al., 2012) y del PRRSV-2 (Wei et al., 2013; Wang et al., 2016). Por otro lado, en Europa, se han realizado ensayos con MLVs comerciales del subtipo 1 del PRRSV-1 (Unistrain® PRRS y Porcilis® PRRS), las cuales proporcionan una protección parcial frente a la cepa HP-PRRSv Lena (prototipo del subtipo 3 del PRRSv-1), reduciendo la replicación del virus, su excreción nasal así como los síntomas clínicos observados (Trus et al., 2014; Bonckaert et al., 2016). En los últimos años se están describiendo continuamente nuevos candidatos vacunales, ya que el uso generalizado de vacunas MLVs frente a cepas HP-PRRSv ha ayudado notablemente a disminuir la incidencia de brotes por estas cepas en China a nivel de granja. Sin embargo, se ha producido un incremento de la diversidad del PRRSv-2 a nivel de campo (Zhou et al., 2014), describiéndose además varios casos de recombinación entre cepas vacunales y cepas HP-PRRSv (Li et al., 2009; Lu et al., 2015) por lo que debemos ser cuidadosos con los programas de vacunación empleados.

### Otras medidas de prevención

Actualmente no existe un tratamiento cien por cien eficaz frente al PRRS, por lo que además de desarrollar un programa de vacunación eficaz que permita homogeneizar el estatus inmunitario de la granja, debemos utilizar otras medidas como control de la bioseguridad, aclimatación de nulíparas y medidas de manejo (Corzo et al., 2010; Zimmerman et al., 2012). En China, los grandes productores de porcino son conscientes de la importancia de estas medidas de prevención combinadas con una estrategia vacunal adecuada, por lo que han redoblado esfuerzos en mejorar las condiciones ambientales de las granjas, la bioseguridad a nivel externo e interno, así como los sistemas de ventilación y filtración del aire. Aplicando estas medidas han conseguido reducir y bloquear la dispersión y circulación de cepas HP-PRRSv no sólo entre los lotes de una misma granja sino también entre granjas. Por último, debido a la elevada virulencia de las cepas HP-PRRSv, la aclimatación de nulíparas mediante contacto con este tipo de cepas no ha funcionado.

Para cerrar este monográfico sobre cepas de alta virulencia del PRRSv, hay que tener en cuenta que el término HP-PRRSv se ha usado indistintamente a lo largo de los tres números para facilitar la comprensión por parte del lector, incluyendo tanto a las cepas virulentas del PRRSv-1 como a las del PRRSv-2. No obstante, no hay que perder de vista que hasta la fecha los brotes asociados a cepas HP-PRRSv en el sureste asiático presentan unas características clínicas y lesionales más marcadas que las observadas con cepas virulentas del PRRSv-1.