Evidencia de la infectividad del virus de la diarrea epidémica porcina (PED) en aerosoles y la detección en muestras de aire de partículas de ARN a largas distancias desde granjas infectadas

Carmen Alonso[1], Dane Goede, Robert Morrison, Peter Davies, Albert Rovira, Douglas Marthaler, Montserrat Torremorell

[1]Candidato a Doctorado. Universidad de Minnesota.
Artículo traducido del inglés por los autores.

1. Introducción

El virus de la diarrea porcina epidémica (VPED, por sus siglas en inglés) es un virus con envoltura proteica perteneciente a la familia *Coronaviridae*, subfamilia *Coronavirinae* y género *Alphacoronavirus* (Saif, et al., 2012). Las consecuencias de la infección del VPED se observaron por primera vez en animales de crecimiento y engorde en Inglaterra y fue identificado y nombrado como el principal causante de la diarrea porcina epidémica (PED) en 1978 (Chasey and Cartwright, 1978; Pensaert and de Bouck, 1978). El principal signo del VPED es una diarrea acuosa con un 100% de morbilidad y 50-100% de mortalidad en lechones de hasta una semana de vida. Su severidad es menor en cerdos mayores o en cerdas.

El VPED fue diagnosticado por primera vez en la región oriental del medio oeste de los Estados Unidos en abril del 2013 (Stevenson, et al., 2013). Su rápida propagación fue evidente a través de las admisiones de muestras a laboratorios especializados, hasta tal punto que entre 4 y 8 semanas después de que el primer caso fuera diagnosticado, el número de estados positivos incrementó de 6 a 12. Posteriormente, el VPED continúo expandiéndose rápidamente y, en Marzo del 2014, la enfermedad fue confirmada en 27 estados (NAHLN Labs, 2014).

A pesar de que la infección del VPED ocurre principalmente a través de la vía fecal-oral, la transmisión aerógena del VPED entre granjas nunca fue probada aunque sí especulada debido a la rápida expansión de la enfermedad a nivel regional. La transmisión de bacterias y de virus asociadas a partículas aerosolizadas durante procesos de defecación o vómito ha sido demostrada en otras enfermedades (Marks, et al., 2003; Kim, et al., 2008). Además, granjas situadas en

la cercanía de focos positivos tiene mayor probabilidad de contraer la enfermedad. La detección de RNA del VPED por un posible proceso de transmisión aerógeno en el mismo espacio con animales ha sido previamente reportado (Hesse and Henry, 2014). Sin embargo, los animales centinelas del estudio no contrajeron la enfermedad por lo que la transmisión aerógena no pudo ser demostrada. Basándonos en la hipótesis de que partículas del VPED pueden permanecer suspendidas en el aire y ser infecciosas, el objetivo del estudio fue el detectar el virus en muestras de aire tomadas en condiciones experimentales y de campo.

Materiales y métodos

Para evaluar la capacidad aerógena e infectiva del VPED en muestras de aire, se llevó a cabo un desafío experimental. Doce cerdos, de 7 a 8 semanas de vida procedentes de una granja naïve a VPED fueron alojados en las instalaciones de investigación animal de la Universidad de Minnesota (35 m^3 nivel de bioseguridad 2). En el día 0 del estudio, cada animal fue intragastricamente inoculado con 20 ml de inóculo de VPED procedente de raspados de mucosa intestinal procedentes de casos positivos admitidos al laboratorio de diagnóstico de la Universidad de Minnesota. El material del inóculo había sido confirmado como positivo por RT-PCR y diluido a un número determinado de copias de ARN/ml basado en una curva standard, cuyo rango era de $3.96x10^{10}$ to $7.57x10^{10}$ (correspondiente a valores de corte (Ct) de la PCR de entre 15 y 16). Después de la inoculación, muestras de aire fueron tomadas por 30 min con un colector ciclónico (Midwest Micro-Tek, Brookings, SD, USA) situado en el centro de la instalación a 1.2 m de altura por encima del nivel de los animales durante 3 días comenzando 24 horas tras el desafío. Las muestras fueron tomadas dos veces al día (mañana y tarde) con dos colectores con el fin de dejar descansar un colector 30 min y alcanzar una correcta desinfección de los aparatos entre replicas. Los controles negativos de los colectores de aire fueron tomados mediante el hisopado de diferentes partes del aparato y las muestras extraídas con medio Stuart (BBL CultureSwabTM, Dickinson y Com., Sparks, Maryland, US). Después de colectar todas las muestras, y hasta su diagnóstico, todas las muestras fueron almacenadas a -80C. A la terminación del estudio todas las muestras fueron enviadas al laboratorio veterinario de la Universidad de Minnesota para su diagnóstico por RT-PCR.

Para evaluar si el VPED podría ser aerosolizado en condiciones de campo, se contactó a 8 granjas de cerdos de Oklahoma (US) todas ellas pertenecientes a una misma compañía. Granjas de engordes y de cerdas que estaban sufriendo brotes agudos de la enfermedad durante cada día de la colección de muestras de aire fueron contactadas. La toma de muestras de aire fue llevada a cabo de una manera práctica para el estudio a distintas distancias (desde 9.6 m to 24.14 km) en la misma dirección del viento comenzando siempre desde la distancia más lejana a la más cercana de cada granja. Un total de 62 muestras fueron tomadas usando el sampleador ciclónico de aire durante 30 min, conservadas en hielo y enviadas al laboratorio de la Universidad de Minnesota para su posterior diagnóstico por RT-PCR.

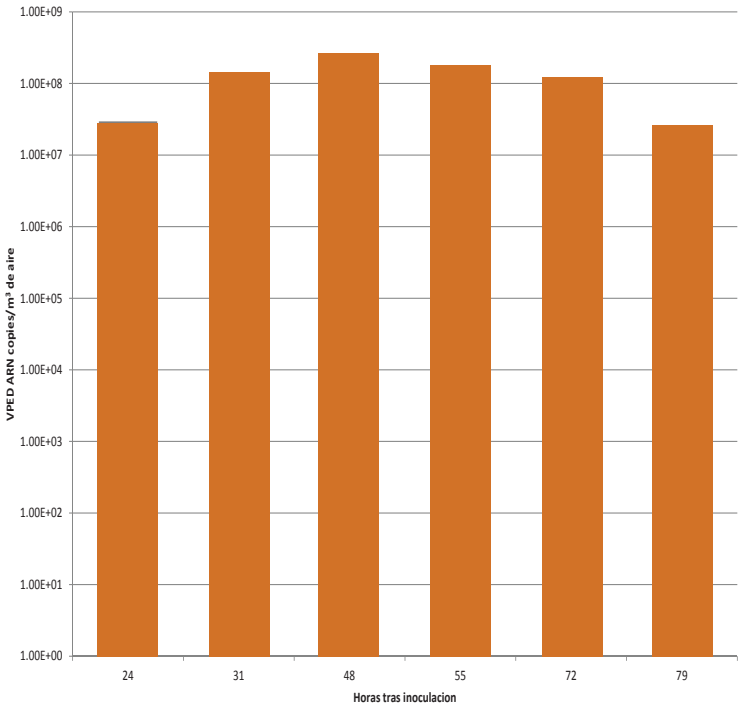

Figura 1. Resultados de RT-PCR procedente de las muestras de aire tomadas de animales experimentalmente infectados. Los resultados son expresados como número de copias por m3 de RNA VPED y horas post inoculación.

Para evaluar la infectividad de cada una de las muestras de aire, se llevó a cabo un grupo de bioensayos en lechones de 10 días de vida alojados individualmente y susceptibles al VPED. La sensibilidad del bioensayo había sido previamente demostrada en estudios pilotos con diluciones seriadas (datos no publicados). El material inoculado en estos lechones consistió en 2 ml de las muestras tomadas en el campo en el exterior de las granjas, o pools de 3 muestras (procedente de la parte experimental del estudio), diluidas 1:10 con buffer fosfato salino para obtener un volumen de 20 ml de material de inóculo por animal. A las 48h tras la inoculación de estos animales, se llevó a cabo su eutanasia y un conjunto de 6 muestras de secciones de yeyuno e íleon fueron tomadas y enviadas para su diagnóstico histopatológico y análisis por PCR.

Resultados

VPED fue detectado en todas las muestras de aire procedente de los cerdos infectados experimentalmente (*Figura 1*). El número estimado de copias de RNA por m^3 de aire fue de $1x10^6$ to $1x10^9$, con valores Ct de entre 26.3 a 22.7. Todos los controles negativos fueron negativos. Los cerdos infectados con las muestras tomadas a nivel experimental mostraron diarrea catalogada de moderada a severa con un rango de número de copias de RNA/ml entre $3.96x10^{10}$ a $7.57x10^{10}$ (valores Ct de 15 a 16). Estos cerdos presentaron lesiones histopatológicas de atrofia entérica catalogadas como moderadas o moderadas-marcadas.

Once de las 62 (18%) muestras de aire tomadas en la parte de campo del estudio fueron positivas a RT-PCR, con un número de copias de RNA de VPED/m^3 de aire que vario entre $4.99x10^5$(a 0.01milla=16m) a $4.21x10^3$ (a 1 milla=1.6 km) (Tabla 1). El material genético de VPED ($7.98x10^3$ copias de ARN de VPED/m^3) fue detectado a 10 millas (25.7 km) a favor de viento desde la granja C. Como mínimo, una muestra de cada granja fue positive (con la excepción de las granjas E y H). El número medio de copias de RNA de VPED /m^3 de aire de las muestras colectadas en el campo ($9.64x10^4 \pm 1.5x10^5$) fue menor (*Student t test*, p <0.001) que el de las muestras colectadas a nivel experimental ($1.25x10^8 \pm 9.16x10^7$). Ninguna de las muestras tomadas en el campo fue positiva a la técnica del bioensayo.

Identificación granja	Tipo de granja (cebo o finalización)	Distancia de la granja (millas)	RT-PCR PEDV (RNA copias/ m^3 de aire)
A	Cebo	0.01	2.05 × 105
B	Cebo	0.01	1.81 × 105
G	Finalización	0.01	4.99 × 105
A	Cebo	0.5	4.04 × 104
C	Cebo	1	2.65 × 104
C	Cebo	1	2.07 × 104
G	Finalización	1	4.21 × 103
C	Cebo	3	1.73 × 104
F	Finalización	3	3.50 × 104
G	Finalización	3	2.36 × 104
C	Cebo	10	7.98 × 103

Tabla 1. Resultados de RT-PCR frente al virus del PED de muestras positivas (expresados como copias estimadas del virus PED /m^3 de aire) colectadas en campo procedentes de diferentes tipos de granjas y a diferentes distancias con respecto a las mismas.

Discusión

El virus causante del PED fue considerado exótico en la población porcina de América del Norte hasta su entrada y

su diagnóstico en abril del 2013. Una vez diagnosticada la enfermedad, la infección se propagó rápidamente entre las granjas provocando pérdidas devastadoras a los productores. Debido a su rápida propagación, la trasmisión aerógena del virus fue sospechada en aéreas muy remotas donde la trasmisión del virus no pudo ser explicada por otras rutas conocidas. En nuestro estudio, evaluamos la detección y la viabilidad de muestra colectadas a nivel experimental con cerdos artificialmente inoculados con VPED. Cerdos inoculados con las muestras de aire tomadas durante esta primera parte del estudio desarrollaron lesiones y síntomas clínicos de PED y el virus fue aislado de sus tejidos. Posteriormente, nuestro estudio demostró el transporte de partículas de RNA del virus a través de aerosoles a nivel de campo procedente de granjas que estaban experimentando brotes agudos hasta distancias de 10 millas. Sin embargo la infectividad de estas muestras no pudo ser demostrada. Este es el primer estudio en el que el VPED ha sido detectado en muestras de aire, en el que su viabilidad para reproducir enfermedad ha sido demostrada en cerdos susceptibles y que el transporte de parte del material genético del VPED puede ser transportando a largas distancias.

Resultados de los bioensayos que se completaron con las muestras de aire bajo condiciones experimentales demostraron la presencia de virus vivo en el aire. Sin embargo, las inoculaciones con muestras procedentes de las granjas

no pudieron reproducir la enfermedad en estos cerdos susceptibles. La falta de infectividad puede ser atribuida a la baja concentración viral de las muestras o a la inactivación del virus debido a la temperatura, la intensidad solar, la intensidad de la radiación ultravioleta o durante el almacenamiento de las muestras. Las muestras de campo fueron colectadas durante el mes de Julio en Oklahoma con unas temperaturas y humedad relativa que oscilaron entre 15 y 28.9º C y 23 to 67% respectivamente. Como consecuencia de estos resultados, más proyectos son necesarios para determinar la dosis infectiva del virus en el aire necesaria para inducir infección de VPED en animales susceptibles y el impacto de factores medioambientales como la luz ultravioleta, la humedad relativa y la temperatura en la viabilidad del VPED.

En resumen, este estudio demuestra por primera vez que el virus del PED puede aerosolizarse, permanecer en aerosoles mientras continua siendo infeccioso y que material genético del virus puede llegar a transportarse a largas distancias procedentes de granjas que están experimentando brotes agudos de la enfermedad. Más estudios son necesarios para evaluar tanto el riesgo de transmisión aerógena del VPED entre granjas, como los programas de control de bioseguridad y de salud animal en las mismas debido a esta ruta de trasmisión.

Estudio íntegramente publicado en *Vet Research* 2014, 45:73

BIBLIOGRAFÍA

Chasey D, Cartwright SF, 1978. Virus-like particles associated with porcine epidemic diarrhoea. *Res. Vet. Sci.* 25, 255-6.

Hesse D, Henry S, 2014. Porcine diarrhea is here… ready or not. .

Kim SW, Raynor PC, Kuehn TH, Goyal SM, Ramakrishnan MA, Anantharaman S, Farnsworth JE, 2008. Optimizing the recovery of surrogates for bacterial bioterrorism agents from ventilation filters. *Clean-Soil Air Water* 36, 601-608.

Marks PJ, Wedgwood K, Vipond IB, Regan FM, Fey RE, Caul EO, 2003. A school outbreak of norwalk-like virus: Evidence for airborne transmission. *Epidemiol. Infect.* 131, 727-36.

NAHLN Labs, 2014. Https://www.aasv.org/pedv/PEDV_weekly_report/. May 15, 2014.

Pensaert, M.B., de Bouck, P., 1978. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. *Arch. Virol.* 58, 243-7.

Saif LJ, Pensaert MB, Sestak K, Yeo S, Jung K. (Eds.), 2012. Coronavirus. Blackwell Publishing, Ames, (Eds.), Diseases of Swine.

Stevenson G, Hoang H, Schwartz KJ, Burrough ER, Dong S, Madson D, Cooper VL, Pillatzki A, Gauger P, Schmitt BJ, Koster LG, Killian ML, Kyoungjin JY, 2013. Emergence of porcine epidemic diarrhea virus in the united states: Clinical signs, lesions, and viral genomic sequences. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 25, 649-54.