

DETERMINACIÓN VIRAL Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL VIRUS DE AUJESZKY EN PLANTAS DE FAENA Y CERDOS SALVAJES, COMO PARTE DEL PROGRAMA OFICIAL DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA EN LA REPÚBLICA ARGENTINA

VIRAL DETERMINATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF AUJESZKY'S DISEASE VIRUS IN SLAUGHTER PLANTS AND WILD BOAR, AS PART AS THE EPIDEMIOLOGICAL SURVEILLANCE OFFICIAL PROGRAM IN ARGENTINA

María Carolina Artuso (Departamento de Biología Molecular, Dirección de Laboratorio Animal-DILAB-Senasa), **Daniela Pereyra** (Departamento de Biología Molecular, Dirección de Laboratorio Animal-DILAB-Senasa), **Alejandro Emilio Pérez** (Departamento de Porcinos, Dirección de Laboratorio Animal DILAB-Senasa), **Gastón Maximiliano Arocena** (Departamento de Biología Molecular, Dirección de Laboratorio Animal-DILAB-Senasa), **Yanina Paola Laksman** (Departamento de Porcinos, Dirección de Laboratorio Animal DILAB-Senasa), **María Gabriela Echeverría** (Cátedra de Virología, Facultad de Veterinaria, UNLP), **María Soledad Serena** (Cátedra de Virología, Facultad de Veterinaria, UNLP), **Carlos Roberto Zenobi** (Departamento de Biología Molecular, Dirección de Laboratorio Animal-DILAB-Senasa), **Héctor Ramón Sanguinetti** (Departamento de Biología Molecular, Dirección de Laboratorio Animal-DILAB-Senasa), **Oscar Enrique Escobar Cabrera** (Departamento de Biología Molecular, Dirección de Laboratorio Animal-DILAB-Senasa)

Resumen

La enfermedad de Aujeszky afecta principalmente a la producción porcina y ocasiona pérdidas económicas importantes. En la Argentina, esta enfermedad es considerada endémica, lo que puede resultar en restricciones de comercialización para la región. Las exigencias del mercado externo obligan a avanzar con los planes de control y erradicación de la enfermedad de Aujeszky. Esta enfermedad limita las posibilidades económicas del sector porcino y la comercialización internacional, lo cual influye negativamente en la rentabilidad de las explotaciones y en la calidad de los productos de origen animal.

Las técnicas serológicas utilizadas solo detectan la presencia de anticuerpos específicos y no permiten detectar directamente la presencia del patógeno en el organismo ni una infección latente. La utilización de la biología molecular para la confirmación y diagnóstico de la enfermedad de Aujeszky en los planes de vigilancia puede convertirse en una herramienta eficaz para la detección temprana de animales infectados con el virus, así como también para la identificación de las variantes genotípicas que circulan en el país. Este conocimiento aportaría información para establecer políticas sanitarias enfocadas en el control de la enfermedad de Aujeszky, tendientes a la erradicación del virus Herpesvirus porcino tipo 1 (SuHV-1) circulante en la Argentina.

Palabras clave: Aujeszky, PCR en tiempo real, aislamiento viral, caracterización molecular, cerdos salvajes, vigilancia.

Abstract

Aujeszky's disease principally affects the porcine production, and it generate important economical lost. Currently, In Argentina, Aujeszky is consider an endemic disease and could result in regional commercial restrictions. International requirements for commercialization oblates to develop plans for control and eradication of Aujeszky's disease.

Serological techniques currently used do not allow to identify if the animal is free of pathogen or if it could be a healthy carrier. In surveillance programs, the implementation of Molecular techniques to confirm the diagnostic of this disease is a necessary tool for obtaining early and rapid results. Furthermore, it is also necessary to achieve the molecular characterization of the circulating strains in Argentina in order to establish sanitary politics for eradication of Aujeszky's disease. This information could allow establishing sanitary politics based on the control of Aujeszky's diseases and eradication of the circulating Suid Herpesvirus type 1 (SuHV-1).

Keywords: Aujeszky, real time PCR, viral isolation, molecular characterization, wild swine, surveillance.

La enfermedad de Aujeszky es una enfermedad contagiosa que provoca pérdidas económicas importantes en la producción porcina debido a la muerte de animales jóvenes, abortos en hembras y deficiencias respiratorias que provocan pérdida de peso en cerdos adultos. En este contexto, se propuso desarrollar un proyecto para ampliar la vigilancia a fin de detectar la presencia del virus de Aujeszky en plantas de faena y en animales salvajes; mediante aislamiento viral y técnicas de biología molecular para su posterior caracterización, análisis epidemiológico y detección de la etapa del ciclo viral en curso. Dentro del marco de los premios Senasa, que buscan promover y generar procesos de investigación y desarrollo de la sanidad animal, entre otros, se esté llevando adelante este proyecto.

El agente causal de la enfermedad de Aujeszky es el herpes virus suino-1 (SuHV-1). El SuHV-1 (herpesviridae-alpha herpesvirinae) es un virus envuelto, de ADN bicatenario (Mettenleiter, 2000). Los cerdos y jabalíes son el reservorio natural de este virus. La enfermedad de Aujeszky en todas las demás especies animales se halla siempre en relación directa o indirecta con cerdos infectados, y generalmente la infección termina de manera ciega, en virtud de su desenlace rápidamente mortal y de la escasa excreción de virus, o bien las cadenas infecciosas se rompen tras unas pocas transmisiones. Los cerdos infectados excretan grandes cantidades de virus en la saliva y en las secreciones nasales, de dos a cuatro semanas después de la infección primaria, y pequeñas cantidades, durante menos tiempo, una o dos semanas de forma intermitente a través de la orina, semen y leche. El mayor peligro de ingreso del virus está en el traslado de cerdos infectados. Los animales que todavía se hallan en fase de excreción de virus provocan de inmediato la infección de los cerdos receptivos. Asimismo, los cerdos son los únicos animales en los que el virus entra en estado de latencia luego de la recuperación clínica (excepto en los lechones de menos de dos semanas de edad, que mueren de encefalitis). Esto puede ocasionar nuevos ciclos de infección por reactivación del virus en forma natural (Mettenleiter, 2000; Yoon *et al.*, 2006) o por contacto con cerdos salvajes infectados (Steinrigl *et al.*, 2012) pudiendo comprometer el estado sanitario de las piaras domésticas.

Una vez ingresado el virus al establecimiento, las características de la infección dependerán de la concentración de animales, el tipo de explotación y de la frecuencia de llenado y vaciado de los alojamientos de los cerdos. En establecimientos que presentan elevada concentración de animales por unidad de superficie y

llevan a cabo ingresos y desalojos de cerdos en forma continua, es altamente probable que el contagio sea total en pocas semanas. Sin embargo, en condiciones de explotación extensiva con porquerizas separadas en pequeños grupos y con baja rotación de animales, la infección podría cursar de forma retardada y afectar solo una parte de los cerdos.

En los cerdos, la gravedad de los signos clínicos depende de la edad, de la vía de infección, de la virulencia de la cepa infectante y del estado inmunitario del animal. Los lechones de corta edad son muy susceptibles, y las tasas de mortalidad alcanzan el 100 % durante las dos primeras semanas de edad. La enfermedad de Aujeszky es endémica en muchas partes del mundo, pero varios países han llevado a cabo programas de erradicación eficaces, como EE. UU., Canadá, Nueva Zelanda y muchos estados miembros de la Unión Europea.

El primer caso de Aujeszky detectado en la Argentina fue en el año 1979 en un establecimiento dedicado principalmente a la cría y engorde de cerdos, en forma extensiva de la provincia de Córdoba. Ante la presencia de una mortandad de cerdos jóvenes, se solicitó la colaboración de la unidad de Patología Animal, de la Facultad de Agronomía y Veterinaria, de la Universidad Nacional de Río Cuarto. Luego de las investigaciones realizadas en la Dirección de Laboratorios y Control Técnico (DILACOT), dependiente de Senasa, se propició su inclusión dentro del grupo de enfermedades que deben ser combatidas con carácter obligatorio.

La enfermedad se controla mediante la contención de las piaras infectadas y el empleo de vacunas o la eliminación de los animales infectados de forma latente (Pejsak y Truszczynski, 2006). En varios países se ha aplicado o se aplica el sacrificio sanitario, normalmente cuando las explotaciones infectadas son pequeñas o cuando el riesgo para las explotaciones vecinas es muy alto en países libres de la enfermedad.

Los animales en latencia dificultan el proceso de erradicación de la enfermedad porque representan potenciales focos de reinfección (Maes *et al.*, 1997). Además, la presencia del virus en cerdos silvestres sigue siendo un interrogante. En el marco de un plan para declarar al país libre de la enfermedad de Aujeszky, y previo al inicio de los planes de vacunación por el Senasa, representa un desafío conocer el estado de las infecciones en los distintos tipos de predios, así como en los animales silvestres para establecer políticas sanitarias adecuadas para el control de la enfermedad.

Actualmente, los esfuerzos de los planes de vigilancia de Aujeszky están centrados en la serología. Sin

embargo, las técnicas de biología molecular pueden detectar la presencia de ADN viral o ARN de latencia del SuHV-1 (Cheung, 1995). El desarrollo de estas metodologías puede ofrecer una herramienta para la detección del virus en estadios más tempranos de la infección, así como en animales con infección latente, lo que promete una mayor capacidad de detección del patógeno. Además, estas técnicas posibilitan la caracterización molecular de las distintas cepas del virus (Serena *et al.*, 2011), permitiendo así identificar las cepas que circulan en las distintas regiones de nuestro país y facilitando un análisis epidemiológico basado en las variantes genotípicas (Paes *et al.*, 2013).

Determinar la presencia del virus de SuHV-1 en animales de plantas de faena y en animales salvajes podría anticipar el comienzo de un brote de la enfermedad, facilitando una respuesta adecuada en situaciones de emergencia sanitaria. Estas decisiones son clave para el aumento de la producción, alcanzar el autoabastecimiento y acceder a mercados externos. En ese contexto, es relevante contar con técnicas de análisis complementarias a las serológicas, generando información de base necesaria en el proceso de vigilancia de la enfermedad. Por otro lado, en un escenario donde la política de vacunación está en discusión, la caracterización molecular del virus brinda conocimiento del estado de situación de la enfermedad en un país sin profilaxis desde 1998. Además, conociendo el perfil genotípico se puede distinguir entre una cepa circulante y una cepa vacunal, principalmente en zonas limítrofes con países que en la actualidad cuentan con planes de vacunación a virus vivo atenuado. De esta forma, la introducción de nuevos elementos de análisis como técnicas de biología molecular para evaluar la problemática de la enfermedad enriquece la discusión acerca de las medidas sanitarias adecuadas para la Argentina.

Dentro de los objetivos planteados se pretende: 1) establecer la metodología para la toma de muestras en plantas de faena y en animales silvestres, 2) recolectar las muestras establecidas y procesarlas de acuerdo a la metodología seleccionada (aislamiento viral, PCR, patrón de restricción), 3) desarrollar el diagnóstico molecular para la detección del virus (SuHV-1), y 4) genotipificar aislamientos de cepas de campo y silvestres del virus de Aujeszky.

La detección de un mayor número de animales portadores del virus garantizaría la eficacia de las medidas propuestas tendientes a la eliminación del virus. En este proceso, se espera que establecer una metodología para la toma de muestras en plantas de faena y su posterior análisis molecular o virológico

en el laboratorio, pueda resultar una herramienta complementaria para el control de la enfermedad en animales con serología negativa o baja carga de anticuerpos. Por otra parte, el conocimiento que se tiene acerca de las cepas presentes en la Argentina es incipiente y aún no permite establecer relaciones regionales acerca del origen y distribución del virus (Serena *et al.*, 2011). En distintas regiones del país, identificar molecularmente las cepas de Aujeszky detectadas en cerdos salvajes o en animales con destino a faena y serología positiva proporcionaría información básica necesaria para profundizar el conocimiento sobre los genotipos del virus que están presentes en la Argentina y su epidemiología. Finalmente, la caracterización molecular de cepas salvajes y domésticas de zonas aledañas podría esclarecer si el origen de los focos de infección en poblaciones domésticas se puede atribuir a las cepas circulantes en poblaciones salvajes.

Metodología

Toma de muestras en cerdos silvestres

Para la toma de muestras en cerdos silvestres se coordinarán las actividades de extracción y remisión de muestras con los responsables del Programa de Porcinos de la Dirección de Programación Sanitaria y de Fauna Silvestre de la Dirección de Epidemiología y Análisis de Riesgo y el grupo de captura de animales salvajes.

Toma de muestras en cerdos comerciales

Se solicitará –por nota– información referente a los establecimientos que están habilitados para faena de cerdos a la Dirección Nacional de Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Se realizará un análisis de la confluencia de movimientos a faena. Como resultado, se confeccionará un listado de los establecimientos que reúnan la mayor parte de la faena del país, y se gestionará con los jefes del servicio del Senasa los permisos pertinentes para la toma de muestras.

Extracción de órganos

En el laboratorio de la Dirección de Laboratorios y Control Técnico (DILAB) del Senasa, se realizarán actividades protocolizadas para extraer ganglio trigémino, músculos maseteros, bulbo olfatorio, cerebro, tonsilas (cuando estén presentes) e hisopados nasales para diagnóstico molecular y aislamiento viral. El procesamiento de las muestras se realizará en paralelo, en el Laboratorio de la Cátedra de Virología de la FCV-UNLP y en los laboratorios de Martínez de la DILAB-Senasa.

Aislamiento de virus de las muestras: Pasajes en células PK₁₅

Las muestras procesadas se inocularán en placas de cultivo de línea celular (PK₁₅), luego de cinco días se repetirá la inoculación. Este proceso se realizará como máximo dos veces. La observación de Efecto Citopático (ECP) en alguno de los pasajes se tomará como indicador de la actividad viral. Las placas con ECP (+) se congelarán y descongelarán para liberar el virus y el sobrenadante se fraccionará en alícuotas. Estas alícuotas son las que se establecen como muestras de campo y pasarían a formar parte del cepario de la Republica Argentina que tiene la DILAB.

Detección del virus (SuHV-1) por Técnicas Moleculares: Puesta a Punto de PCR en Tiempo Real

Extracción de ADN a partir de distintas matrices

Para evaluar la extracción de ADN en los tejidos recomendados para la detección del virus de Aujeszky, se trabajará con muestras de ganglio trigémino, bulbo olfatorio, cerebro y tonsillas. Para la extracción se utilizarán kits comerciales como el QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen).

Reacción de PCR

Se seleccionará como *housekeeping* un fragmento de ADN conservado del gen 12S rRNA porcino, y se amplificará por PCR convencional. Por relevamiento bibliográfico de laboratorios de referencia, y producto del alineamiento de secuencias de Aujeszky disponibles en el Gen Bank se diseñará un set de primers que amplifiquen un fragmento de la gD del virus de Aujeszky. Se seleccionará la gD por ser una glicoproteína conservada presente en la membrana del SuHV-1. El perfil de termociclado para la PCR, así como las concentraciones finales de los reactivos para la reacción (mix), se ajustarán a lo largo del desarrollo y puesta a punto de la técnica. Con el objetivo de desarrollar una técnica que permita diferenciar cepas vacunales de las de campo se llevará a cabo una PCR Dúplex en tiempo real para Aujeszky. La cepa vacunal comúnmente usada en la Argentina es la cepa Bartha, que presenta una deleción en la gE. Esto posibilita diferenciarla de las cepas circulantes en el campo por la ausencia de dicha glicoproteína. En una PCR Dúplex en tiempo real se podría, en forma simultánea, confirmar la presencia de Aujeszky si se detecta gD y en función de la presencia o ausencia de amplificación del gen de la gE, se determinaría el origen de la cepa. Si la amplificación es solo de gD pero no de gE, entonces la cepa presente en la muestra analizada sería vacunal. De esta manera, se logra diferenciar

una muestra de un animal infectado con el virus de Aujeszky con una cepa de campo de un animal vacunado.

Controles

Para obtener Controles Positivos se infectará un cerebro de cerdo libre de Aujeszky con diluciones seriadas de la Cepa TL/92 (provista por la Cátedra de Virología de la FVC-UNLP). Por otra parte, se probará como control positivo un stock de la cepa Shope realizado en cultivo celular de la línea PK₁₅. Como Control Negativo se utilizarán tejidos de cerdo libres de Aujeszky criados en cautiverio.

Conclusión

La intención de este proyecto es contribuir a la vigilancia serológica que se desarrolla actualmente en nuestro país, aportando una visión complementaria, enfocada en la detección del agente viral causante de la enfermedad de Aujeszky. Si se logra desarrollar de forma eficiente una vigilancia que permita detectar el virus SuHV-1 en animales enviados a faena y en animales silvestres por técnicas moleculares y de aislamiento viral, se podría determinar de forma directa el estado sanitario de los cerdos en la Argentina. Este conocimiento, posibilitaría establecer políticas sanitarias adecuadas a cada situación en nuestra región, pudiendo discriminar entre animales que se encuentran en estado de latencia, aquellos que atraviesan una infección en curso y los que solo presentan anticuerpos. Por otra parte, evaluar el origen de los focos de infección y caracterizar las cepas circulantes no solo presenta ventajas a nivel de los estudios de epidemiología, sino que también permite, con miras a la implementación de vacunas, conocer las necesidades de profilaxis en nuestro país en función de las cepas de SuHV-1 circulantes en la región.

Bibliografía

- Cheung, A. K. (1995), "Investigation of pseudorabies virus DNA and RNA in trigeminal ganglia and tonsil tissues of latently infected swine", *American Journal Veterinary Research*, 56 (1), pp. 45-49.
- Maes, R. K.; M. D. Sussman, A. Vilnis y B. J. Thacker (1997), "Recent developments in latency and recombination of Aujeszky's disease (pseudorabies) virus", *Veterinary Microbiology*, 55, pp. 13-27.

- Mettenleiter, T. C. (2000), "Aujeszky's disease (pseudorabies) virus: the virus and molecular pathogenesis-State of the art, June 1999", *Veterinary Research*, 31, pp. 99-115.
- Paes, R. C. S.; A. A. Fonseca Junior, L. A. R. C. Monteiro, G. C. Jardim, U. Piovezan, H. M. Herrera, R. A. Mauro y O. Vieira-da-Motta (2013), "Serological and molecular investigation of the prevalence of Aujeszky's disease in feral swine (*sus scrofa*) in the subregions of the Pantanal wetland, Brazil", *Veterinary Microbiology*, 165, pp. 448-454.
- Pejsak, Z. K. y M. Truszczyński (2006), "Aujeszky's disease (Pseudorabies), en Straw B. E., Zimmerman J. J., D'Allaire S. y D. J. Taylor (eds.), *Diseases of Swine*, Blackwell Science, Oxford, UK, pp. 419-433.
- Serena, M. S.; G. E. Metz, E. C. Mórtola y M. G. Echeverría (2011), "Phylogenetic análisis of suid herpesvirus 1 isolates from Argentina", *Veterinary Microbiology*, 154, pp. 78-85.
- Steinrigl, A.; S. Revilla-Fernández, J. Kolodziejek, E. Wodak, Z. Bagó, N. Nowotny, F. Shmoll y J. Kofer (2012), "Detection and molecular characterization of Suid herpesvirus type 1 in Austrian wild boar and hunting dogs", *Veterinary Microbiology*, 157, pp. 276-284.
- Yoon, H-A, S-K Eo, A. G. Aleyas, S-Y Cha, J-H Lee, J-S Chae, H-K Jang, J-G Cho y H-J Song (2006), "Investigation of pseudorabies virus latency in nervous tissues of seropositive pigs exposed to field strain", *Journal Veterinary Medical Sciences*, 68 (2), pp. 143-148.