

UNA ACTUALIZACIÓN SOBRE EL SÍNDROME RESPIRATORIO Y REPRODUCTIVO PORCINO, SU SITUACIÓN NACIONAL Y AVANCES EN INVESTIGACIÓN

PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME UPDATE: NATIONAL SITUATION AND RESEARCH PROGRESS

ESTEBAN RAMÍREZ P. (M. V.)¹

SUMMARY

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is an emerging viral disease in swine and considered the single most economically important disease of pigs worldwide, which causes highly contagious severe disease with a spectrum of states ranging from respiratory failure in neonates and nursery pigs to reproductive failure in pregnant gilts and sows. PRRSV is endemic to most swine producing countries and imposes a heavy economic burden due to high mortality associated with the disease. In Chile, the disease was recognized at the beginning of the year 2000, and rapidly a control and eradication program was developed by the government and the private enterprises.

Since the recognition of the disease to the present time, innumerable groups of investigators have formed around the world, which has been translated in an immense amount of scientific information. In Chile the research has been focused to characterize the respiratory disease caused by the virus and the mechanisms of transmission and excretion, in order to obtain more data on the pathogenesis of the Chilean isolate. In the following article will be presented an updated revision of the main etiological aspects, clinical, pathological, epidemiological and diagnostic tests of the disease. Moreover it will be analyzed the national situation, from the detection of the virus to the control measures and the eradication program taken by the authorities. Finally there are presented the preliminary results from the investigations that are being made with the isolated Chilean of the PRRSV.

KEY WORDS: *Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS, Chilean isolated.*

PALABRAS CLAVE: *Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino, PRRS, Aislado chileno.*

1. INTRODUCCIÓN

El Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS) fue reportado por primera vez en 1987 en Carolina del Norte (Estados Unidos), donde se presentó una epidemia de una enfermedad reproductiva de tipo agudo en cerdas, caracterizada por aumento de abortos tardíos, nacidos muertos, nacidos débiles y retraso en el retorno al estro y, por otra parte, enfermedad respiratoria en lechones y cerdos destetados con altas tasas de mortalidad. A su vez, epidemias clínicamente similares fueron reconoci-

das en Canadá en 1987 (Dea *et al.*, 1992) y en Japón en 1989 (Shimizu *et al.*, 1994). En ausencia de una causa reconocida para esta enfermedad se le designó el nombre de “Enfermedad Misteriosa del Cerdo” (Wensvoort *et al.*, 1991) y una gran variedad de etiologías fueron propuestas erróneamente.

En 1990 se presentaron los primeros indicios de la enfermedad en Europa. En Alemania se presentaron más de 3.000 brotes hasta mayo de 1991, diseminándose rápidamente por todo el continente. En 1994, el PRRS fue oficialmente reconocido en 16 países de 3 continentes diferentes (América, Asia y Europa).

Inicialmente se emplearon diversas denominaciones para referirse a la enfermedad; sin embargo, en 1991 se propuso oficialmente el nombre de “Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino”

¹ Escuela de Graduados, Doctorado en Ciencias Agropecuarias Mención Patología Animal, Universidad de Concepción. Avenida Vicente Méndez 595, Chillán.

(PRRS, por sus siglas en inglés), el cual fue reconocido por la Oficina Internacional de Epizootias (OIE), designando al agente causal como virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV).

En la actualidad, la enfermedad se encuentra distribuida ampliamente a través del planeta y ha causado fuertes estragos en la industria porcina, por lo cual ha sido motivo de una intensa red de investigaciones a nivel mundial con el fin de entender su patogénesis y lograr elaborar medidas de control cada vez más eficientes. Chile no ha sido la excepción. Es así que desde el año 2002 se viene realizando una serie de investigaciones conjuntas entre el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) y la Universidad de Concepción con el fin de caracterizar los cuadros respiratorios y las vías de transmisión y excreción del aislado chileno del PRRSV.

En la siguiente revisión se presentan las principales características del virus y la enfermedad con información actualizada, dando especial énfasis a la situación nacional y los resultados preliminares de las investigaciones realizadas en el país.

2. ETIOLOGÍA

El agente etiológico responsable del síndrome fue aislado por primera vez en cultivos de macrófagos alveolares pulmonares (MAPs) por Wensvoort *et al.* (1991) en Holanda, y fue denominado virus Lelystad (LV, I-1102). En 1992 el virus (ATCC VR-2332) fue aislado en Estados Unidos en línea celular CL 2621 por Collins *et al.* (1992). Ese mismo año fue aislado en otros países como Francia, España y Canadá.

El PRRSV es un virus ARN, esférico, envuelto, pequeño (48-83 nm de diámetro), con una nucleocápside central icosaédrica de 30 a 35 nm de diámetro (Benfield *et al.*, 1992), el cual fue clasificado como miembro del género *Arterivirus*, Familia *Arteriviridae*, Orden *Nidovirales* (Cavanagh, 1997). Dentro de esta Familia se incluyen otros virus, tales como el virus de la arteritis viral equina (EAV), el virus del aumento de la deshidrogenasa láctica del ratón (LDV) y el virus de la fiebre hemorrágica del simio (SHFV), los cuales presentan un alto grado de similitud con respecto a su organización genómica y presentan características biológicas comunes como la capacidad de replicar en macrófagos, producir infección asintomática persistente y una gran plasticidad genómica. Desde el punto de

vista genético, el PRRSV estaría más relacionado con LDV que con EAV (Meulenberg *et al.*, 1993). De hecho, Plagemann (2003) propuso una hipótesis en la cual afirma que el origen y evolución de los genotipos del PRRSV deriva de la mutación del LDV que habría infectado a cerdos silvestres en Europa central, diseminando la infección a Estados Unidos a través de importaciones desde Europa en 1912.

2.1. AISLADOS DEL PRRSV

Una de las características más importantes de este virus corresponde a la gran variedad de cepas que han sido aisladas. En general, estos aislados han sido clasificados en dos modelos distintos, el norteamericano y el europeo, de acuerdo a sus diferencias biológicas, clínicas, patológicas, antigénicas y moleculares (Halbur *et al.*, 1996b, Nelson *et al.*, 1993; Chung *et al.*, 2002). Las variaciones antigénicas y genéticas han sido demostradas utilizando anticuerpos monoclonales y reacción en cadena de la polimerasa (PCR), respectivamente. Genéticamente el virus presenta una hebra simple, poliadenilada, no segmentada de ARN en sentido positivo. Su genoma posee un tamaño de 13 a 15 kilobases y está conformado por 7 marcos abiertos de lectura (ORFs). El ORF 1 se divide en 1a y 1b, se ubica en el extremo 5' del genoma viral, y comprende aproximadamente el 75% de éste. Estos ORFs codifican las proteínas involucradas en los procesos de replicación y transcripción (RNA polimerasa) y varias proteínas no estructurales. Los ORF 2 al 7, ubicados en el extremo 3', codifican proteínas estructurales del PRRSV, del 2 al 6 las proteínas de la envoltura y el 7 las que conforman la nucleocápside (Proteína N). El número de aminoácidos codificados entre los ORF 2 al 7 para el aislado norteamericano VR-2332 es 256, 254, 178, 200, 174 y 123, respectivamente, en comparación con el virus Lelystad que presenta 249, 265, 183, 201, 173 y 128 aminoácidos, respectivamente (Meng *et al.*, 1995).

2.2. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

El PRRSV es inactivado por solventes como cloroformo y éter, lo cual explica la presencia de una envoltura lipídica. Del mismo modo, está demostrado que el virus es termolábil y pH lábil. El PRRSV es estable a la congelación por meses o años a tem-

peraturas de -70 y -20 °C, pero a medida que ésta va aumentando, la capacidad infectante del virus disminuye hasta ser completamente inactivado a 37 °C por 48 horas o a 56 °C por 45 minutos (Benfield *et al.*, 1992). A su vez, el virus es estable a pH 6,5-7,5, pero su infectividad disminuye rápidamente a pH menor de 6 y mayor de 7,5 (Bloemraad *et al.*, 1994). De acuerdo a estas características es muy probable que el virus no persista durante largos períodos de tiempo en el medio ambiente.

3. PATOGENIA

Se considera que la infección y replicación del PRRSV se limita solamente a células pertenecientes al linaje monocito/macrófagos en el organismo de cerdos infectados y, como es de esperar, el pulmón es un sitio predominante de replicación viral. Al respecto, se ha demostrado la replicación en monocitos, macrófagos pulmonares intravasculares (MIPs), células de la microglia del cerebro y macrófagos esplénicos (Molitor *et al.*, 1997; Thanawongnuwech *et al.*, 1997), pero el virus presentaría preferencia por los macrófagos alveolares pulmonares (MAPs), especialmente de cerdos menores 6 semanas de edad, y por macrófagos inmaduros o recientemente activados (Molitor *et al.*, 1997). En cerdos susceptibles, el virus ingresaría principalmente a través de la vía respiratoria al organismo infectando macrófagos residentes de las superficies mucosas, traqueobronquiales o alveolares (sitio primario de replicación), para luego ser transportado de forma intracelular o libre a través de la linfa hasta los linfonódulos regionales donde puede replicar en macrófagos residentes (sitio de replicación secundaria) (Rossow, 1998). La exposición del virus a la mucosa respiratoria produciría una viremia dentro de las primeras 12 horas post-infección (Rossow *et al.*, 1995), periodo en el cual se han identificado antígenos virales en macrófagos del epitelio respiratorio, pulmonares y tonsilares (Rossow *et al.*, 1996). Esto coincide con lo observado por Pol *et al.* (1997a), quienes demostraron que la progenie viral puede ser observada entre las 9 a 12 horas posterior a la inoculación de MAPs con PRRSV, sugiriendo que el ciclo de replicación viral es extremadamente rápido en estas células. Del mismo modo, Meng *et al.* (1996) demostró que la mayor producción de virus infecciosos ocurre entre 24 y 48 hpi y se mantiene por 60 a 70 horas. De esta forma, el virus puede distribuirse a través

de la sangre y replicar en distintas poblaciones de monocitos o macrófagos en todo el organismo (Rossow, 1998), lo cual ha sido demostrado por la presencia de antígenos virales en cornetes nasales, pulmón, linfonódulos, corazón, timo, vasos sanguíneos, bazo, hígado, glándulas adrenales, riñones, intestino, cerebro y testículos (Halbur *et al.*, 1995a; Halbur *et al.*, 1996a; Rossow *et al.*, 1996; Sur *et al.*, 1997).

El virus ingresaría a la célula blanco por endocitosis mediada por una proteína receptora de la membrana plasmática (Suárez, 2000), observándose ya a las 3 hpi degeneración celular, y a las 6 hpi partículas virales envueltas dentro de la célula, las cuales son eliminadas por exocitosis o lisis celular (Pol *et al.*, 1997a), aunque la mayoría se liberan de la última forma (Suárez, 2000). Así también se han descrito fenómenos de apoptosis en pulmón y órganos linfoides (Sur *et al.*, 1998; Labarque *et al.*, 2003); sin embargo, existen discrepancias con respecto a la inducción de este fenómeno. Suárez *et al.* (1996) sugieren que la glicoproteína viral GP5 (expresada por el ORF 5 del genoma viral) estaría directamente involucrada en los fenómenos de apoptosis observados en células infectadas, pero estudios más recientes han demostrado que la mayoría de las células apoptóticas no son necesariamente células positivas al virus, lo cual sugiere mecanismos indirectos implicados en el proceso (Sur *et al.*, 1998), probablemente mediado por citoquinas proinflamatorias, como el Factor de Necrosis Tumoral y variadas interleucinas (Labarque *et al.*, 2003), cuya liberación ha sido demostrada también en estudios recientes (Feng *et al.*, 2003; Labarque *et al.*, 2003).

3.1. ASPECTOS CLÍNICOS Y PATOLÓGICOS

Una de las características más importantes de un brote infeccioso producido por el virus es la variabilidad en la expresión clínica de la enfermedad. Uno de los aspectos involucrados en este hecho corresponde a la patogenicidad de él o los aislados virales que se puedan presentar en uno o distintos planteles. Halbur *et al.* (1995b) y Halbur *et al.* (1996b) compararon la patogenicidad de distintos aislados norteamericanos entre sí y con el virus Lelystad en cerdos inoculados experimentalmente, observando marcadas diferencias en la intensidad de la presentación de cuadros respiratorios, lesiones macroscópicas e histológicas. Rossow (1998)

establece que la manifestación de enfermedad clínica es edad dependiente. También pueden presentarse cuadros subclínicos que pueden derivar en infección asintomática persistente o resolución.

3.1.1. Cuadros clínicos

Dos grupos de signos clínicos se han asociado con esta enfermedad: respiratorios y reproductivos.

Cuadros respiratorios:

El PRRSV causa enfermedad respiratoria en cerdos de todas las edades; sin embargo, la intensidad del cuadro varía entre las distintas etapas dentro del sistema productivo.

Los síntomas respiratorios más característicos en neonatos son disnea, hiperapnea, taquipnea, marcada respiración abdominal, edema periocular, conjuntivitis y aumento de tamaño de los linfonódulos (Collins *et al.*, 1992; Rossow *et al.*, 1995; Done y Paton, 1995; Halbur *et al.*, 1995b; Halbur *et al.*, 1996b). Así también se asocian síntomas compatibles con alteración del sistema nervioso central como letargia, somnolencia, temores e inapetencia (Rossow *et al.*, 1999). La mortalidad en esta etapa es alta y puede alcanzar el 100% (Rossow, 1998).

En cerdos de cría suele predominar sintomatología respiratoria, fiebre, anorexia, letargia y retraso en el crecimiento (Done y Paton, 1995; Rossow, 1998). La fiebre rara vez supera los 40 °C y la anorexia se presenta más bien como una inapetencia transitoria que aparece a lo largo de varios días en distintos animales. En cerdos inoculados experimentalmente, las manifestaciones respiratorias comienzan a ser evidentes alrededor de los 3 dpi, alcanzando su máxima intensidad alrededor de los 15 dpi (Rossow *et al.*, 1995; Halbur *et al.*, 1996b). A pesar que la sintomatología está bien descrita en esta etapa, es prácticamente imposible medir los efectos causados por el virus propiamente tal, ya que normalmente se producen infecciones secundarias por otros virus o bacterias, siendo éstas las que determinan frecuentemente la presentación de la enfermedad y causan un marcado aumento de la mortalidad (Rossow, 1998). El mecanismo por el cual la infección por el PRRSV predispone a los cerdos a infecciones secundarias estaría explicado por la destrucción de los MAPs (importante mecanismo de defensa contra patógenos inhalados), los cuales son reemplazados por macrófagos inmaduros menos eficientes en el control de infecciones bacterianas, lo cual trae como consecuencia septicemia y neumonía (Pijoan *et al.*, 1994). Del mis-

mo modo, el daño directo sobre los MIPs producto de la replicación viral involucra la pérdida de un mecanismo extremadamente importante en la remoción bacteriana desde la circulación (Thanawongnuwech *et al.*, 1997). De hecho, existe evidencia experimental que demuestra que la infección por el PRRSV aumenta la susceptibilidad a *Bordetella bronchiseptica* (Brockmeier y Lager, 2002), *Salmonella choleraesuis* (Wills *et al.*, 2000) y, especialmente, *Mycoplasma hyopneumoniae* (Tacker *et al.*, 1999), cuya coinfección resulta hoy en día uno de los problemas respiratorios más comunes en cerdos de engorda y que acarrea más pérdidas a la industria porcina; sin embargo, no está del todo claro la predisposición a otras bacterias que causan enfermedad respiratoria en cerdos como *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Pol *et al.*, 1997b), *Pasteurella multocida* (Carvalho *et al.*, 1997) y *Haemophilus parasuis* (Solano *et al.*, 1997).

En cerdos de engorda, chanchillas, cerdas reproductoras y verracos los síntomas se caracterizan sólo por fiebre transitoria y anorexia (Done y Paton, 1995; Rossow, 1998), por lo cual resulta de vital importancia el empleo de técnicas diagnósticas adecuadas, ya que éstas pueden ser el único indicador válido de la presencia del virus en estos animales.

Cuadros reproductivos:

En cerdas gestantes, expuestas al virus, los signos reproductivos más importantes incluyen abortos tardíos durante el último tercio de gestación, nacimientos de cerdos débiles y un aumento en el número de cerdos nacidos muertos, autolíticos o momificados (Terpstra *et al.*, 1991; Chistianson *et al.*, 1992; Rossow, 1998). Los abortos pueden presentarse esporádicamente o como “tormentas de abortos” o pueden observarse persistentemente por periodos que van desde las 10 a 12 semanas hasta los 4 a 6 meses en un plantel infectado (Rossow, 1998).

En verracos, las alteraciones reproductivas se caracterizan por una disminución en la libido, reducción de la cantidad de semen y en alteraciones morfológicas y funcionales de los espermatozoides (Sur *et al.*, 1997). Las anomalías descritas en el semen se discuten posteriormente.

3.1.2. Lesiones

Como ya se mencionó anteriormente, las principales lesiones producidas por la infección del PRRSV se desarrollan en los sitios en los cuales el virus replica preferentemente. De esta forma, la mayor variedad e intensidad de lesiones macro y microscó-

picas se producen en pulmones y tejido linfóide producto de la replicación viral en macrófagos residentes en estos tejidos y, por ello, las lesiones se desarrollan rápidamente en contraste a lo observado en otros órganos como cerebro, corazón, riñón e hígado donde las lesiones son de menor intensidad y se desarrollan más tarde en el transcurso de la infección principalmente producto del daño endotelial producido por el virus (Rossow *et al.*, 1995; Halbur *et al.*, 1996b).

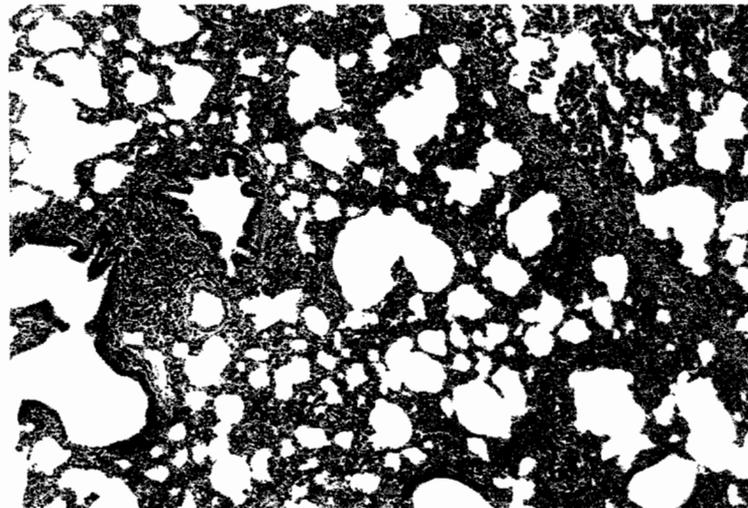
Las lesiones pulmonares han sido descritas ampliamente por diversos autores en cerdos inoculados experimentalmente (Pol *et al.*, 1991; Collins *et al.*, 1992; Done y Paton, 1995; Rossow *et al.*, 1994; Rossow *et al.*, 1995; Rossow, 1998; Halbur *et al.*, 1995b; Halbur *et al.*, 1996b; Feng *et al.*, 2001; Ramírez *et al.*, 2003). El hallazgo más importante es la presencia de neumonía intersticial evidente entre los 3 y 28 dpi, con mayor severidad alrededor de los 10 dpi. Macroscópicamente la presencia de alteraciones pulmonares puede variar dependiendo de la virulencia de la cepa o de infecciones bacterianas secundarias. De hecho, las lesiones pueden ser inaparentes u observarse consolidación de parénquima pulmonar y un moteado de color rojo grisáceo que puede ser focalizado en los lóbulos craneales o difuso en el tejido pulmonar, así como fluido edematoso en la superficie pulmonar y septos interlobulillares distendidos (Rossow *et al.*, 1995; Rossow, 1998; Halbur *et al.*, 1995b; Halbur

et al., 1996b). Microscópicamente es evidente la presencia de neumonía intersticial con engrosamiento de septos alveolares (Figura 1) por infiltrado de macrófagos, linfocitos y células plasmáticas, hiperplasia e hipertrofia de neumocitos tipo II, detritus celulares y macrófagos necróticos en alvéolos, células sinciciales e hiperplasia de tejido linfóide peribronquial (Pol *et al.*, 1991; Collins *et al.*, 1992; Done y Paton, 1995; Rossow *et al.*, 1994; Rossow *et al.*, 1995; Rossow, 1998; Halbur *et al.*, 1995b; Halbur *et al.*, 1996b; Feng *et al.*, 2001; Ramírez *et al.*, 2003). Ocasionalmente se han descrito lesiones en las vías aéreas caracterizada por inflamación del epitelio bronquial (Pol *et al.*, 1991) y subsecuente pérdida de cilios (Done y Paton, 1995).

Con respecto a los órganos linfoides, es frecuente observar linfoadenopatía, especialmente en las regiones torácicas, cervicales e inguinales. En estudios experimentales se han descrito aumento de tamaño de linfonódulos entre 2 a 10 veces su tamaño normal entre los 4 y 28 dpi, con aspecto edematoso, consistencia firme, color blanco grisáceo con un patrón típico de hiperplasia linfóide difusa o nodular y, ocasionalmente, con pequeñas vesículas quísticas bajo la cápsula (Rossow *et al.*, 1994; Rossow *et al.*, 1995; Halbur *et al.*, 1995b). Las lesiones microscópicas se centran principalmente en los centros germinales de los folículos linfoides donde se puede observar necrosis linfóide y de macrófagos, depleción y espacios quísticos con fluido proteiná-

FIGURA 1

NEUMONÍA INTERSTICIAL CON ENGROSAMIENTO DE SEPTOS E INFILTRADO POR CÉLULAS MONONUCLEARES EN UN CERDO INOCULADO CON EL AISLADO CHILENO DEL VIRUS PRRS Y SACRIFICADO A LOS 14 DPI. HEMATOXILINA Y EOSINA. 200X.



ceo y restos celulares (Rossow *et al.*, 1994; Rossow *et al.*, 1995; Rossow, 1998; Ramírez, 2003). Así también, Halbur *et al.* (1995b) observaron células sinciciales de 2 a 10 núcleos localizados preferentemente en la periferia de los folículos linfoides afectados; sin embargo, este hallazgo debe ser cuidadosamente evaluado, ya que resulta una observación muy frecuente en cerdos coinfectados con *Circovirus Porcino* tipo 2 (PCV-2) (Ellis *et al.*, 2004). En otros tejidos linfoides no suelen observarse lesiones macroscópicas pero microscópicamente se ha descrito necrosis linfoide, depleción, hiperplasia en el timo, en folículos y manguitos linfoides periarteriolares del bazo y en los folículos linfoides de tonsilas y placas de Peyer (Pol *et al.*, 1991; Halbur *et al.*, 1995b; Feng *et al.*, 2001; Ramírez *et al.*, 2003).

En el corazón se ha descrito miocarditis linfoplasmodioma e histiocítica comúnmente de localización perivascular y subendocardial (Halbur *et al.*, 1995b; Halbur *et al.*, 1996b; Rossow *et al.*, 1994, Rossow *et al.*, 1995; Rossow, 1998; Ramírez *et al.*, 2003).

En el sistema nervioso central las lesiones más características corresponden a encefalitis o leucoencefalitis linfocítica moderada con presencia de manguitos perivascuales mononucleares y gliosis multifocal (Collins *et al.*, 1992; Rossow *et al.*, 1995; Rossow, 1998; Halbur *et al.*, 1995b; Halbur *et al.*, 1996b; Ramírez *et al.*, 2003). En algunos estudios realizados con cepas de campo se han descrito lesiones encefálicas más severas como vasculitis necrotizante en el cerebro (Thanawongnuwech *et al.*, 1997; Rossow *et al.*, 1999).

En el epitelio nasal se han descrito lesiones en etapas tempranas de la infección (alrededor de las 12 hpi) caracterizadas por pérdida de cilios, inflamación y exfoliación epitelial, espacios quísticos y metaplasia escamosa (Pol *et al.*, 1991; Collins *et al.*, 1992; Rossow *et al.*, 1995; Rossow, 1998; Halbur *et al.*, 1995b; Halbur *et al.*, 1996b).

En riñón, estómago y vasos sanguíneos las lesiones son poco frecuentes, pero se han descrito agregados linfocitarios y de células plasmáticas periglomerulares y peritubulares, manguitos perivascuales en vasos sanguíneos de mucosa y submucosa y vasculitis, respectivamente (Rossow *et al.*, 1995; Halbur *et al.*, 1996b; Cooper *et al.*, 1997).

A pesar de la gran variedad y distribución de las lesiones causadas por el PRRSV, desde el punto de vista del diagnóstico histopatológico, sólo tienen valor las muestras de pulmón, órganos linfoides, encéfalo y corazón, en tanto que el valor diagnós-

tico desde el punto de vista macroscópico es escaso o nulo.

En el tracto reproductor de la hembra y el macho, también han sido descritas algunas lesiones causadas por la infección viral. En cerdas gestantes, las lesiones uterinas se caracterizan por infiltrados perivascuales linfocíticos multifocales y fluido edematoso en el miometrio y endometrio (Christianson *et al.*, 1992). En tanto, Sur *et al.* (1997) demostraron la capacidad del virus de replicar en células del epitelio germinativo y macrófagos del intersticio testicular en verracos inoculados experimentalmente, constatando además alteraciones caracterizadas por hipoespermatogénesis, presencia de células gigantes de 2 a 15 núcleos, abundantes células necróticas y depleción del epitelio germinal.

3.1.3. Infección persistente

La capacidad de producir infección persistente, resulta una característica común para todos los virus clasificados dentro de la familia Arteriviridae (Cavanagh, 1997) y el PRRSV no es la excepción. Este hecho se sustenta en diversos estudios realizados desde comienzos de los 90. Zimmerman *et al.* (1992) demostraron que algunos cerdos inoculados experimentalmente eran capaces de transmitir el virus a cerdos susceptibles a los 99 dpi. Más tarde, Albina *et al.* (1994) demostraron que las crías de cerdas inoculadas a los 90 días de gestación eran capaces de transmitir el virus a los 154 días de edad luego de ser sometidas a tratamientos inmunosupresivos con corticoides. Christopher-Henning *et al.* (1995a) aislaron el virus desde las glándulas bulbouretrales de un verraco sacrificado a los 101 dpi. En 1997, Wills *et al.* (1997b) aislaron el virus en 1 cerdo a los 157 dpi a través de muestras orofaríngeas. Recientemente, Wills *et al.* (2003) detectaron el virus en suero (1/28) y tonsilas (2/28) a los 251 dpi, utilizando RT-PCR en cerdos inoculados y sugirieron que en algunos cerdos se podrían presentar niveles muy bajos de replicación y el ARN viral podría ser detectado esporádicamente. Estos estudios demuestran que algunos cerdos pueden permanecer infectados por varios meses y que el virus podría ser removido del organismo 3 a 4 meses después de la infección.

La caracterización y detección de la infección persistente por PRRSV es un punto clave a ser considerado al momento de establecer una estrategia de control y erradicación dentro de un plantel, ya que estos animales son una potencial ruta de infección y transmisión a cerdos susceptibles.

3.1.4. Patología clínica

Halbur *et al.* (2002) realizaron un estudio en el cual fue evaluado el efecto de diversos aislados norteamericanos del PRRSV en sangre y médula ósea, demostrando que los cerdos cursan con anemia no regenerativa y un incremento significativo en la relación mieloide: eritroide (M: E) entre los 3 y 21 dpi, lo cual fue más evidente mientras más neumovirulento era el aislado viral. También se constató una disminución transitoria en el número de linfocitos y monocitos entre los 3 y 7 dpi. También se describió anemia leve en cerdos inoculados con el aislado chileno del PRRSV, pero los leucocitos presentaron un aumento entre los 7 y 21 dpi, mientras que la relación M: E no sufrió alteraciones (Ramírez, 2003; Ramírez *et al.*, 2004). Así también, Nielsen y B-tner (1997) demostraron que cerdos de 4 meses y medio de edad inoculados con el virus cursan con leucopenia y linfopenia transitoria. A su vez Rossow *et al.* (1994) reportaron leucopenia a los 4 y 7 dpi, asociada a una disminución en los neutrófilos, linfocitos y monocitos, en cerdos expuestos al virus.

También se ha descrito leucopenia con linfopenia y monocitopenia, en cerditos infectados *in utero*, a los tres días después de nacidos. A su vez, se registró hipoplasia de la médula ósea de leve a severa intensidad caracterizada por un aumento en el número de precursores mieloides y eritroides (Feng *et al.*, 2001).

4. EPIDEMIOLOGÍA

4.1. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Hoy en día, el PRRS se considera una enfermedad endémica en la gran mayoría de los países con producción intensiva de cerdos; sin embargo, algunos constituyen excepciones y se encuentran libres de la enfermedad, como por ejemplo Suecia, Suiza y Noruega en Europa, Australia y Nueva Zelanda en Oceanía y Ecuador, Brasil y Argentina en Sudamérica (OIE, 2004). Es importante mencionar que algunos de estos países poseen una masa porcina pequeña con importaciones de cerdos muy bajas y por lo tanto son menos vulnerables a ingresar el virus, al compararlos con otros países altamente especializados en la producción porcina y cuya importación de cerdos son muy superiores (Zimmerman, 2003). Sin embargo, esto no implica que países con menor producción no sean del todo vulnerables y

un buen ejemplo al respecto lo constituye Chile que se encuentra positivo a la enfermedad desde el año 2000.

4.2. RUTAS DE EXPOSICIÓN

Uno de los factores importantes que deben ser conocidos dentro de un plantel infectado sometido a un plan de control o erradicación, es la capacidad infectante que posee el PRRSV. Un estudio realizado por Yoon *et al.* (1999) demostró que el virus es altamente infeccioso, al observar que tan sólo 10 partículas virales inoculadas vía intranasal e intramuscular a cerdos de 4 a 5 semanas de edad, eran capaz de producir infección por ambas rutas.

Además de la vía intraanal e intramuscular, existen otras rutas de ingreso del virus como la vía vaginal, oral e intraperitoneal (Zimmerman, 2003).

La inseminación artificial es una ruta potencial de exposición e infección de las cerdas cuando se usa semen proveniente de verracos infectados (Yaeger *et al.*, 1993; Gradil *et al.*, 1996).

El riesgo de infección a través de la vía oral no está del todo clarificado. En condiciones de campo la contaminación del alimento y agua con fecas y orina podría ser una ruta potencial de infección a cerdos susceptibles vía oral, pero esto no ha sido del todo demostrado (Zimmerman, 2003). Recientemente, Van der Linden *et al.* (2003) detectaron el virus en músculos de cerdos inoculados con aislados norteamericanos y europeos del PRRSV (donantes) y, posteriormente, al alimentar a cerdos susceptibles (receptores) con carne de los cerdos inoculados, lograron detectar viremia a los 6 días postalimentación y, a su vez, éstos fueron capaces de transmitir el virus a cerdos centinelas.

4.3. EXCRECIÓN VIRAL

Las principales vías de eliminación del virus corresponden a saliva, secreciones nasales, semen, secreción láctea, orina y probablemente fecas. Hay una serie de factores que determina mayor o menor excreción viral, entre los que se cuentan la inmunidad adquirida previamente, la virulencia del aislado viral, la edad de infección de los animales, infecciones bacterianas secundarias y factores que desencadenen estrés (Zimmerman, 2003).

Wills *et al.* (1997a) aislaron el virus desde saliva a los 42 dpi, orina a los 14 dpi, suero a los 21 dpi

y desde muestras orofaríngeas a los 84 dpi; sin embargo, no pudieron aislarlo en muestras de fecas ni de tómulas conjuntivales. Por otra parte, Rossow *et al.* (1994) aislaron el virus desde muestras de secreciones nasales y fecas en un cerdo de 2 semanas de edad y en uno de 4 semanas de edad a los 21 dpi, y en un cerdo de 1 semana de edad y en otro de 4 semanas de edad a los 28 dpi. Del mismo modo, de 19 muestras de orina colectadas, el virus fue aislado sólo en un cerdo de 10 semanas de edad a los 28 dpi. En contraste, Yoon *et al.* (1993) describieron gran eliminación viral a través de las heces durante 35 días de observación. La eliminación fecal del virus no está del todo resuelta pero debe ser considerado especialmente en aquellos planteles que aclimatan a sus chanchillas de reemplazo a los patógenos del criadero con fecas de cerdas adultas.

Con respecto a la eliminación viral a través del semen, Sur *et al.* (1997) demostraron que el PRRSV puede replicar en espermátidas y espermatoцитos del epitelio germinal del testículo. Swenson *et al.* (1994) detectaron el virus a los 13, 25, 27 y 43 dpi en semen de 4 verracos inoculados experimentalmente. Así también, el ARN viral ha sido detectado en semen de verracos infectados a los 92 dpi y aislado desde las glándulas bulbouretrales a los 101 dpi (Christopher-Henning *et al.*, 1995a).

La excreción del PRRSV a través de secreciones de la glándula mamaria fue descrita por Wagstrom *et al.* (2001), quienes demostraron que cerdas inoculadas durante el último tercio de gestación eliminan el virus a través de secreciones mamarias, pero si éstas son vacunadas previamente no eliminan el virus en la lactancia siguiente.

4.4. TRANSMISIÓN

Como ya se dijo anteriormente, el PRRSV es altamente infeccioso pero no muy contagioso, lo cual explica de cierta forma que dentro de un mismo corral se puedan presentar cerdos positivos y negativos. A su vez, debemos reconocer que si un cerdo se encuentra en la etapa aguda de la infección, eliminará mayor cantidad de virus y las posibilidades de transmisión y, por lo tanto, de diseminación son mayores que lo que se puede esperar de un cerdo persistentemente infectado. Desde este punto de vista es ampliamente conocido que la principal vía de transmisión del virus ocurre por contacto directo entre animales infectados y no infectados; sin embargo, existen varias vías indirectas a través de las

cuales el virus puede diseminarse a la población susceptible entre las que se incluyen fomites, aerosoles, artrópodos y la infección transplacentar.

4.4.1. Transmisión horizontal

La transmisión directa del virus involucra un contacto estrecho (“nariz con nariz”) entre animales infectados y susceptibles o contacto con secreciones orgánicas excretadas desde cerdos infectados como las que ya se mencionaron. Al respecto juega un importante papel en la transmisión la conducta social de los cerdos, que se establece dentro de un corral en orden a establecer jerarquías sociales, lo cual desencadena peleas que traen como consecuencias heridas cortantes de la piel o mordeduras especialmente en cabeza, cuello y orejas, lo cual implica contacto directo entre la saliva de un cerdo que puede estar infectado y la sangre de un cerdo susceptible. En un estudio realizado por Wills *et al.* (1997c) se demostró que la transmisión del virus entre cerdos en contacto estrecho en un mismo corral ocurre fácilmente en comparación con cerdos localizados en otros corrales laterales a distancias de 102 cm o menos, determinando de este modo que el virus puede transmitirse sin contacto directo. Por otra parte, Bierk *et al.* (2001) demostraron que cerdas inoculadas y puestas en contacto directo con cerdas negativas pueden transmitir el virus. Las cerdas inoculadas fueron positivas hasta los 76 dpi y en 3 de 12 cerdas de contacto el virus fue detectado a los 49, 56 y 86 dpi, demostrándose, además, por secuenciación de ácidos nucleicos, que el virus presente en ambos grupos de cerdas eran homólogos.

La transmisión indirecta, aquella que no implica un contacto estrecho entre animales, puede que ocurra en la práctica pero ha sido muy difícil de demostrar en condiciones experimentales. El papel de los fomites en la transmisión del virus ha sido descrito y pueden ser potenciales transmisores de la enfermedad. Otake *et al.* (2002a) demostraron que el uso de agujas de inyección sin recambio y contaminadas con sangre puede transmitir eficientemente el virus del PRRS en la masa porcina. Del mismo modo, la contaminación con fluidos orgánicos de los instrumentos comúnmente usados dentro de un plantel (como, por ejemplo, descolmilladores, cortadores de cola, marcadores de oreja, etc.) deben ser considerados potenciales transmisores de la enfermedad. También se ha demostrado que otros objetos inanimados como las botas, overoles y las manos de los operarios pueden jugar un importan-

te rol en la transmisión del virus, el cual puede permanecer por cerca de una hora después del contacto con cerdos con infección aguda (Otake *et al.*, 2002b). Así también, Amass *et al.* (2000) en una investigación para evaluar si las personas serían vectores mecánicos de la enfermedad, lograron aislar el virus desde tómulas nasales de una persona 2 días después de haber estado en contacto con cerdos infectados, pero esta persona no actuó como vector mecánico de transmisión del PRRSV. En otro estudio realizado recientemente, Dee *et al.* (2004) desarrollaron un modelo experimental para evaluar el rol de los vehículos de transporte de cerdos en la transmisión viral, demostraron que la contaminación experimental de trailers, construidos a escala, puede infectar cerdos expuestos por 2 horas dentro del trailer y a su vez la transmisión desde éstos a cerdos centinelas puestos en contacto directo por 2 horas. Así también determinaron que los protocolos de limpieza de camiones que utilizan secado mejora la bioseguridad en los vehículos transportadores.

Por otra parte, diversos estudios han sido realizados para determinar la transmisión a través de algunos artrópodos que podrían actuar como vectores mecánicos de la enfermedad. Otake *et al.* (2002c) estudiaron el papel del mosquito *Aedes vexans* en la transmisión, capturando 300 de ellos desde un plantel infectado, permitiéndoles posteriormente la alimentación desde cerdos virémicos infectados experimentalmente y luego puestos en contacto con cerdos centinelas. De esta forma se demostró la transmisión del virus por esta vía en 2 de las 4 repeticiones realizadas, demostrando además la homología de los virus por secuenciación genómica. Del mismo modo, se ha demostrado que este virus puede sobrevivir tanto en el exterior como interior de moscas (*Musca domestica*) que se han alimentado desde cerdos infectados (Otake *et al.*, 2003b) y jugarían un importante rol en la transmisión del virus a cerdos susceptibles (Otake *et al.*, 2003a); sin embargo, todos estos estudios se han realizado bajo condiciones controladas de laboratorio dejando un vacío con respecto al rol que jugarían estos artrópodos en la epidemiología de la enfermedad en condiciones de campo. Para dilucidar esto, Schurrer *et al.* (2004) diseñaron un experimento con el fin de evaluar si las moscas pueden adquirir efectivamente el virus desde una población de cerdos infectados, transportarlo y dispersarlo dentro de un área geográfica de 2,3 kilómetros (km), para lo cual se utilizaron trampas localizadas a distintas distancias desde la granja infectada. Los re-

sultados revelaron que las moscas efectivamente pueden contaminarse con el virus y transportarlo hasta una distancia de 1,7 km desde la granja infectada, por lo cual estos artrópodos deberían ser considerados como posibles agentes diseminadores del virus entre plantales porcinos en condiciones de campo.

Por otro lado, es importante mencionar el rol que cumplirían algunas especies no porcinas en la transmisión de la enfermedad, especialmente algunas especies de aves. Zimmerman *et al.* (1997) fueron los primeros en describir este hecho luego de exponer patos silvestres al virus a través del agua de bebida. Sus resultados demostraron la eliminación viral desde las fecas a los 39 dpi y, a su vez, la transmisión del virus entre patos y del pato a los cerdos, tras exponer a estos últimos al virus aislado de las fecas de patos. Sin embargo, en un estudio reciente se inocularon patos por vía oral y a través de agua contaminada y fueron puestos en contacto cercano con cerdos centinelas por 21 días, no siendo posible demostrar la transmisión desde los cerdos a los patos ni de los patos a los cerdos (Trincado *et al.*, 2004b).

La transmisión aérea del virus ha sido motivo de controversia los últimos años y se han realizado múltiples investigaciones para poder aclarar el rol de los aerosoles en la transmisión, pero gran parte de ellas se han hecho bajo condiciones controladas y a cortas distancias. Torremorell *et al.* (1997) lograron reproducir la enfermedad a través de la transmisión aérea del virus desde cerdos inoculados con el aislado virulento VR-2332, a cerdos susceptibles separados por una distancia de 1 metro. Resultados bastante similares obtuvo Wills *et al.* (1997c), quienes determinaron la transmisión del virus a distancias de 42 y 102 cm; sin embargo, ellos establecen que no fue posible determinar si la transmisión se produjo a través del aire o a través de la exposición a fluidos corporales contaminados (fecas, orina o alimentos) provenientes de los cerdos infectados. Así también, Brockmeir y Lager (2002) lograron transmitir el virus a través de cámaras de aislamiento unidas por tubos de 1 metro de largo, en 3 de los 4 ensayos realizados. Así también, Otake *et al.* (2002d) lograron transmitir la enfermedad desde infectados a centinelas a una distancia de 2,5 metros en un mismo espacio aéreo, pero no así con cerdos localizados a 30 metros de distancia. En un estudio reciente, no se consiguió la transmisión desde cerdos infectados a centinelas a través de un tubo de 15 metros de largo y las muestras de aire reco-

lectadas resultaron negativas al PRRSV por PCR y aislamiento viral (Trincado *et al.*, 2004a). Muchos de los estudios mencionados anteriormente no lograron demostrar consistentemente la transmisión aérea, ya sea porque emplearon muy bajo número de cerdos inoculados para diseminar la infección, o porque los cerdos centinelas fueron expuestos por muy poco tiempo a cerdos infectados. De esta forma, está bien demostrado que no resulta fácil probar la transmisión aérea en condiciones experimentales. En un estudio reciente se realizaron 3 ensayos donde el volumen de aire transmitido desde la unidad de cerdos infectados a la unidad de cerdos centinelas fue de 70, 10 y 1%, respectivamente, obteniéndose en el primer ensayo un 94% de centinelas infectados y en los otros 2 ensayos un 100% de animales infectados (Kristensen *et al.*, 2004). En este estudio la transmisión aérea fue eficientemente demostrada en comparación a los estudios anteriormente presentados y los autores lo atribuyen principalmente al mayor número de cerdos utilizados en periodo de tiempo más largo; así también se utilizaron cerdos naturalmente infectados de tal forma de poder obtener mayor similitud con respecto a la diseminación de la enfermedad en condiciones de campo. Por otra parte, en un estudio publicado recientemente se demostró que bajo condiciones controladas de laboratorio, el virus puede ser transportado a distancias de hasta 150 metros, manteniendo su capacidad infecciosa, aunque la concentración de partículas virales disminuye en un 50% cada 33 metros (Dee *et al.*, 2005).

Sin embargo, para estimar con mayor precisión la transmisión por esta vía se necesita realizar estudios epidemiológicos a gran escala para determinar el rol que jugarían el virus en el aire como potencial mecanismo de transmisión entre planteles comerciales. También debe establecerse el número de partículas virales presente en los aerosoles de cerdos infectados por unidad de tiempo, el grado de inactivación viral según las condiciones ambientales (temperatura, humedad, radiación ultravioleta, etc.) y, finalmente, estimar la dosis infecciosa mínima para infectar cerdos susceptibles (Zimmerman, 2003). Muchos de los mecanismos de transmisión aquí mencionados deben ser incorporados al protocolo de bioseguridad de cada plantel y ser supervisados estrictamente de tal forma de evitar la diseminación dentro y entre los planteles.

4.4.2. Transmisión vertical

Como ya fue mencionado, el PRRSV produce fa-

llas reproductivas en cerdas gestantes principalmente durante el último tercio y existe evidencia experimental que demuestra la transmisión transplacentaria del virus durante este periodo. Christianson *et al.* (1992) demostraron que cerdas inoculadas a los 93 días de gestación con homogeneizados de pulmón de cerdos infectados y con el aislado VR-2332, presentaron una disminución significativa en el número de cerdos nacidos vivos y aumento de fetos muertos en comparación con las cerdas controles (medias de 5,8-6,9 v/s 12,7-0,3, respectivamente) y el virus fue aislado desde 50 de 76 cerdos nacidos débiles, demostrando así la transmisión transplacental. Así también, Lager y Mengeling (1995) observaron que la muerte fetal temprana no es común y los fetos serían resistentes a la infección en esta etapa, pero existirá una gran probabilidad de infección transplacental durante la gestación tardía.

Por otra parte, como ya se mencionó anteriormente, Wagstrom *et al.* (2001) demostraron la presencia del virus en la leche de cerdas infectadas; sin embargo, la transmisión del virus a lechones por esta vía no ha sido demostrada.

5. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico basado en signos clínicos, como, por ejemplo, fallas reproductivas en machos y hembras o problemas respiratorios en cerdos de producción, resulta extremadamente subjetivo y sólo puede proveer un diagnóstico tentativo de infección dentro de un plantel. Desde este punto de vista, una revisión acabada de los registros de un plantel, especialmente los reproductivos, puede ser un buen punto de partida para detectar la enfermedad. De esta forma, un plantel infectado endémicamente y con signos clínicos activos presentará en sus registros aumento de número de abortos, pariciones prematuras, aumento de tiempo de retorno al estro después de la lactancia, disminución del número de cerdos nacidos vivos, aumento de momificados y autolíticos, etc. Sin embargo, debe considerarse que los síntomas varían ampliamente entre planteles y entre cerdos de acuerdo al sistema productivo, al flujo de animales, el estatus sanitario, medidas de bioseguridad, entre otras. Además, las infecciones subclínicas y los animales persistentemente infectados son comunes y los síntomas respiratorios o reproductivos por otros agentes virales o bacterianos pueden ser muy similares. Por otra parte, no existen lesiones macroscópicas ni microscópicas patognomónicas

cas y muchas veces las lesiones causadas por otros agentes patógenos pueden ser muy parecidas o “esconder” las lesiones causadas por el PRRSV. De esta forma, cuando el diagnóstico presuntivo sugiere infección por el PRRSV, éste debe ser confirmado a través de diversas técnicas de laboratorio que permitan detectar anticuerpos contra el virus, su genoma o aislarlo.

5.1. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS (SEROLOGÍA)

Diversos test serológicos han sido desarrollados para la detección de anticuerpos anti-PRRSV, entre los que se cuentan la prueba de inmunoperoxidasa en monocapa celular (IPMA), inmunofluorescencia indirecta (IFI), prueba de inmunoabsorbancia ligada a enzimas (ELISA) y la seroneutralización viral (SNV). El primero de ellos ha sido ampliamente usado en los laboratorios diagnóstico de Europa, mientras que los tres siguientes son más usados por los laboratorios norteamericanos (Yoon *et al.*, 2003).

La detección de anticuerpos para los test de IPMA, IFI y ELISA presentan una cinética bastante similar entre ellos. Los títulos comienzan a ser detectados entre los 7 y 14 dpi, alcanzando su máximo alrededor de los 30 a 50 dpi para posteriormente comenzar a declinar entre los 4 a 6 meses postinfección hasta niveles indetectables (Yoon *et al.*, 1995).

El IPMA es un test que presenta alta especificidad y sensibilidad. Normalmente se utilizan como fuentes de antígenos MAPs infectados, pero puede ser adaptado para ser usado en líneas de cultivos celulares como CL2621 o MARC-145 (Wensvoort *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 1993). Se consideran positivas aquellas muestras que presenten títulos > 160 y negativas aquellas con títulos < 10 y en muestras de suero se consideran sospechosos títulos entre 10 y 40 (Anon, 1996, citado desde Yoon, *et al.*, 2003). La IFI es una variedad de la IPMA y presenta alta especificidad (más de un 99%), pero se desconoce su sensibilidad al analizar animales individualmente. Se consideran positiva aquellas muestras que presenten títulos entre 16 o 20, pero debe considerarse que la interpretación puede variar entre los distintos laboratorios. Si bien, ambas técnicas son confiables, no resultan prácticas, ya que necesitan laboratorios con equipamiento especial, son laboriosas y no pueden ser automatizadas para análisis a gran escala (Nodelijk, 2002).

La prueba de ELISA indirecta fue desarrollada por primera vez por Albina *et al.* (1992) para la detección de anticuerpos contra el PRRSV y también se ha demostrado su alta especificidad y sensibilidad. Se han desarrollado diversos test de ELISA indirectos y en bloque. El kit comercial de ELISA más utilizado (HerdChek® PRRS ELISA, IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, Maine), considera una relación de muestras positivas (S/P) \geq a 0,4 y su especificidad ha sido estimada en un 99,3 a 99,5% (Nodelijk *et al.*, 1996). Una de las desventajas del test de ELISA es la aparición ocasional de falsos positivos, aunque se ha estimado que eso ocurre en un rango que no va más allá de un 0,5 a 2% (Yoon *et al.*, 2003). El desarrollo de ELISA para el diagnóstico de la enfermedad ha resultado extremadamente ventajoso debido a que puede ser automatizado, ejecutado rápida y económicamente a gran escala y detecta anticuerpos contra aislados norteamericanos y europeos (Cho *et al.*, 1997; Nodelijk, 2002).

La SNV es un método muy poco usado en la actualidad, principalmente debido a la menor sensibilidad que presenta en comparación con las otras técnicas serológicas mencionadas. Este test es usado para detectar anticuerpos neutralizantes en líneas celulares de crecimiento viral como CL 2621, pero no permite la detección temprana de la enfermedad, ya que los anticuerpos neutralizantes contra la infección por el PRRSV aparecen tardíamente (1 a 2 meses pi). El uso de esta técnica podría tener mayor valor para detectar animales persistentemente infectados o viremias prolongadas (Wills *et al.*, 1997b).

En la Tabla 1 se resumen las principales propiedades de las pruebas serológicas en cuanto a su capacidad de detección de anticuerpos.

5.2. DETECCIÓN DEL VIRUS

La presencia del PRRSV puede ser demostrada por aislamiento viral utilizando cultivos celulares específicos, por detección de antígenos virales en tejidos o por la detección del ARN viral.

El aislamiento es una prueba diagnóstica definitiva. El PRRSV puede replicar en dos tipos de células: MAPs (Wensvoort *et al.*, 1991) y líneas celulares de riñón de mono verde africano. De esta forma el aislamiento viral se puede realizar eficientemente en líneas celulares MARC-145 (clon de la línea celular MA-104) (Kim *et al.*, 1993), CL 2621

TABLA 1
PROPIEDADES DE LAS PRUEBAS SEROLÓGICAS USADAS EN EL DIAGNÓSTICO
PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-PRRS (YOON *ET AL.*, 2003)

<i>Test serológico</i>	<i>Detección anticuerpos</i>	<i>Pick de anticuerpos</i>	<i>Anticuerpos no detectados</i>
IFA	5-9 dpi	30-50 dpi	4-5 meses pi
IPMA	9-11 dpi	35-50 dpi	11-12 meses pi
ELISA	9-13 dpi	30-50 dpi	4 \geq 10 meses pi
SVN	9-28 dpi	60-90 dpi	12 meses pi

(Collins *et al.*, 1992) y CRL11171 (Meng *et al.*, 1996). En general, el uso de MAPs constituye el método más sensible para aislar el virus; sin embargo, resulta más costoso que el uso de líneas celulares. Debe tenerse presente que algunos aislados crecen mejor o exclusivamente en MAPs que en otras líneas celulares o viceversa y, a su vez, las diferentes células usadas o lotes de MAPs para el aislamiento no son igualmente susceptibles a los distintos aislados virales (Nodelijk, 2002). Las muestras de elección para realizar el aislamiento viral es el suero, pulmón o fluidos obtenidos de lavados broncoalveolares en brotes agudos de la enfermedad, especialmente en cerditos jóvenes donde la viremia puede durar entre 2 a 6 semanas, mientras que en animales adultos la viremia es más corta, por lo cual es preferible realizar el aislamiento desde los tejidos, siendo de elección pulmón y tejido linfoide, aunque también se puede usar corazón y cerebro (Mengeling *et al.*, 1995; Rossow, 1998). En el caso de animales persistentemente infectados, las muestras de preferencia son tonsilas o fluidos orofaríngeos (Mengeling *et al.*, 1995; Wills *et al.*, 1997b). El virus es más estable en suero que en tejidos. Los tejidos, una vez extraídos, deben ser refrigerados a 4 °C o congelados a -20 °C (Yoon *et al.*, 2003). Por otra parte, la identificación de los aislados virales se realiza a través de inmunotinción, utilizando anticuerpos monoclonales específicos. Aunque esta técnica es extremadamente sensible y específica, resulta bastante laboriosa y de un alto costo (Nodelijk, 2002).

Las técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) e inmunofluorescencia directa (IFD) han sido usadas para detectar anticuerpos contra el PRRSV en tejidos. Aunque ambas técnicas pueden ser usadas en tejidos congelados o fijados con formalina, la IHQ es más sensible que la IFD en la detección de antígenos, pero requiere más tiempo y es más caro. Además, IFD es un test específico aunque no siempre muy sensible, especialmente cuando los tejidos

no se encuentran bien conservados (Yoon *et al.*, 2003). Por otra parte, estas técnicas tienen mayor aplicación en investigación que en diagnóstico de rutina, pero ofrecen ventajas desde el punto de vista de poder diagnosticar animales individualmente. La IHQ ha sido realizada en varios órganos para detectar el antígeno viral. Por ejemplo, Rossow *et al.* (1996) demostraron que existe una clara correlación entre la presencia de lesiones neumónicas multifocales con una distribución antigénica también multifocal. Del mismo modo antígenos virales han sido detectados usando esta técnica en tejidos linfoides, corazón, timo, bazo, hígado, riñón, glándulas adrenales, cerebro, cornetes nasales y testículos (Pol *et al.*, 1991; Halbur *et al.*, 1995a; Halbur *et al.*, 1995b; Halbur *et al.*, 1996a; Rossow *et al.*, 1996; Rossow *et al.*, 1999; Sur *et al.*, 1997; Ramírez *et al.*, 2003; Malinarich *et al.*, 2004). Por otra parte, se pueden utilizar anticuerpos monoclonales específicos para detectar antígenos altamente conservados entre aislados norteamericanos y europeos o se pueden utilizar anticuerpos monoclonales contra epitopos menos conservados para evaluar las diferencias antigénicas existentes entre los distintos aislados del PRRSV. (Nelson *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1999). El anticuerpo SDOW17 ha sido ampliamente utilizado para estos fines y se ha demostrado su capacidad de reaccionar con aislados norteamericanos y europeos del PRRSV (Nelson *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1999; Ramírez *et al.*, 2003; Malinarich *et al.*, 2004). Finalmente, es importante mencionar que los tejidos fijados en formalina al 10% por más de 48 horas pueden disminuir drásticamente la presencia de antígenos en los tejidos (Rossow, 1998).

Por otra parte, en el último tiempo se ha incrementado el uso de técnicas moleculares para la detección del ARN viral en tejidos y muestras clínicas. La prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método altamente específico, sensible y rápido para detectar el PRRSV y presenta ventajas en cuanto a que se puede utilizar

en muestras que resultan citotóxicos para la detección por aislamiento viral en cultivos celulares, como, por ejemplo, semen (Christopher-Henning *et al.*, 1995b), fecas o fetos abortados (Cheon y Chae, 2000). Este método indica la presencia del material genético del virus, pero no necesariamente indica la capacidad infecciosa de éste. El PCR detecta el virus a través de la amplificación de un segmento del ácido nucleico, utilizando la enzima transcriptasa reversa (RT-PCR) para convertir el ARN viral extraído en ADN complementario, el cual es posteriormente amplificado utilizando una polimerasa (*Taq* polimerasa) y primers específicos para determinados segmentos del genoma viral (Suárez *et al.*, 1994). Guarino *et al.* (1999) desarrollaron un estudio con el fin de comparar la detección de diferentes regiones del genoma a través de RT-PCR, utilizando primers para los ORF 4, 6 y 7 de aislados norteamericanos de campo y para el ORF 1b del virus Lelystad, logrando amplificar el segmento del genoma en el 100% de los casos para el ORF 7 y en 92, 96 y 88% de los casos para el ORF 4, 6 y 1b, respectivamente, lo cual indica que el ORF 7 puede ser considerado un blanco potencial para la detección de distintas cepas del PRRSV. Algunas modificaciones han sido utilizadas en el procedimiento para aumentar la sensibilidad de la prueba como el RT nested PCR (RT-nPCR) en el cual se amplifica un segmento del ADN ya amplificado previamente con un segundo set de primers (Horter *et al.*, 2002). En estudios realizados con el aislado chileno del PRRSV se logró detectar exitosamente el genoma viral amplificando el ORF7, utilizando RT-nPCR (Sandoval, 2004).

Del mismo modo, los ácidos nucleicos virales pueden ser detectados por hibridación *in situ* (ISH) en tejidos fijados, utilizando una muestra de ARN no radiomarcada específica para el ORF7 del PRRSV (Yoon *et al.*, 2003). El desarrollo de esta técnica ha permitido localizar la ruta que sigue el virus en los cerdos a través de largos periodos post-infección, con gran sensibilidad, detectando células positivas (macrófagos principalmente) en pulmón y tejido linfoide hasta los 42 dpi, y en placas de Peyer del ileon y riñones (Sur *et al.*, 1996). Así también esta prueba puede ser usada para hacer estudios retrospectivos de la infección y para determinar de forma más precisa la patogénesis.

A pesar del gran uso que se le está dando hoy en día a las técnicas de diagnóstico moleculares, en la práctica estos métodos aún pueden parecer relativamente caros.

6. SITUACIÓN DEL PRRS EN CHILE

6.1. DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD

Como se mencionó anteriormente, el PRRS se detectó en Chile entre los años 1999 y 2000 a través de un monitoreo serológico realizado por el Servicio Agrícola y Ganadero. De un total de 2.328 muestras, 277 reaccionaron positivamente a la presencia del virus (11,8%) (Mathieu *et al.*, 2000). Los análisis serológicos se realizaron en el Departamento de Laboratorios Centrales y Estaciones Cuarentenarias Agrícolas y Pecuarias perteneciente al SAG.

De inmediato se coordinaron acciones conjuntas entre el SAG, la Asociación de Productores de Cerdos de Chile (ASPROCER) y la empresa privada que contempló la elaboración de un proyecto de control y erradicación de la enfermedad del país. En enero del año 2001 se establece una normativa legal del Gobierno de Chile que impulsa la ejecución de este proyecto que contempla la confirmación del diagnóstico, la formación de un comité técnico que incluye expertos extranjeros en la enfermedad y la elaboración de los pasos a seguir con el objetivo de erradicar la enfermedad en un plazo de 4 años.

Para determinar la situación epidemiológica del país se realizó un nuevo monitoreo que contempló todos los planteles de cerdos con más de 50 hembras en el país, obteniéndose un total de 6.179 muestras de animales de 150 unidades productivas pertenecientes a 112 planteles de cerdos (2.675 muestras de hembras, 499 muestras de cerdos de crianza de 70 días y 3.005 muestras de cerdos de engorda de 140 días). Los resultados determinaron la presencia de 22 planteles con serología compatible a infección con PRRSV, de los cuales 19 se concentraban en la Región Metropolitana. En tres de estos planteles se tomó la decisión de despoblar. De los 19 planteles restantes, 18 presentaban niveles superiores al 50% de tasa de reactores y 14 de ellos presentaba sobre un 80% de animales seropositivos. De esta forma, la situación epidemiológica del país se determinó como endémica con escasa o nula manifestación clínica y de baja prevalencia, no superior al 6% en relación al total de hembras existentes (Ruiz *et al.*, 2003).

Por otra parte, los resultados de los análisis virológicos realizados en el Centro de Diagnóstico Veterinario del Departamento de Veterinaria y Ciencias Biomédicas de la Universidad de Nebraska-Lincoln, Estados Unidos, determinaron que el virus aislado correspondió al serotipo norteamericano que había

sido identificado en ese país entre 1992 y 1993 (Ruiz *et al.*, 2003).

No se sabe exactamente en qué año entró el PRRSV en Chile. Si bien sólo se encontró seropositividad en el año 2000, no significa que la enfermedad no haya estado presente en Chile antes de esa fecha.

Las formas más probables de diseminación del virus, especialmente entre los planteles de la Región Metropolitana, se habría producido a través de dos vías: (1) la venta de animales desde planteles infectados a terceros, la comercialización de ellos en feria y la posterior crianza de traspatio de estos animales en zonas con alta densidad de planteles de crianza intensiva de cerdos y (2) el flujo de cerdos desde planteles infectados a matadero. Adicionalmente se debe considerar la falta de bioseguridad de muchos criaderos, lo cual permitió la entrada de la enfermedad de forma más fácil.

A la fecha los avances han sido satisfactorios. El 31 de diciembre del año 2004 finalizó con éxito el desdoblamiento de los 7 planteles monositios infectados suscritos al convenio para control y erradicación del PRRS. De esta forma, actualmente se encuentran positivos a la enfermedad sólo 2 planteles multisitios en el país.

Debido al impacto que la enfermedad tuvo en el país y las repercusiones económicas en los planteles infectados, hoy se han implementado medidas de bioseguridad drásticas, se han regularizado las rutas de transporte de animales a matadero y se ha capacitado y mentalizado al personal de los efectos del PRRS sobre la industria porcina en pos a evitar rebrotes en planteles que lograron erradicar la enfermedad y evitar la diseminación a otros que permanecen libres, de tal forma de conseguir el objetivo de erradicar la enfermedad del país dentro del transcurso del año 2005.

6.2. CARACTERIZACIÓN DEL AISLADO CHILENO DEL PRRSV

Paralelamente a las acciones conjuntas entre el SAG y ASPROCER para erradicar la enfermedad, una serie de investigaciones científicas están siendo realizadas por el Departamento de Patología y Medicina Preventiva de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Concepción con el objetivo de caracterizar los cuadros respiratorios producidos por el aislado chileno del PRRSV, la distribución antigénica en tejidos y detección serológica y molecular.

Estudios preliminares realizados en cerdos de 3 semanas de edad inoculados por vía intranasal e intramuscular con el aislado chileno han demostrado la presencia de lesiones macroscópicas de leve intensidad, caracterizadas principalmente por la presencia de conjuntivitis, edema periocular y leve aumento de tamaño de los linfonódulos. Así también, fueron descritas alteraciones hematológicas leves caracterizadas por una disminución del volumen globular y una tendencia, tanto de las proteínas plasmáticas totales y del fibrinógeno a aumentar entre los 7 y 14 dpi en los cerdos inoculados. En tanto, el recuento de leucocitos totales presentó un aumento asociado al incremento en monocitos, linfocitos y neutrófilos (Ramírez, 2003; Ramírez *et al.*, 2004a). Las lesiones histopatológicas son caracterizadas por la presencia de neumonía intersticial entre los 7 y 21 dpi con mayor intensidad alrededor de los 14 dpi (Figura 1). A su vez, en linfonódulos retrofaríngeos y medistínicos, tonsilas, bazo y timo, las lesiones se caracterizaron principalmente por presentar depleción leve y apoptosis linfoide (Figura 2). Otras lesiones observadas con menor intensidad fueron rinitis, miocarditis y encefalitis no purulenta (Ramírez, 2003; Ramírez *et al.*, 2003). Por otra parte, antígenos virales fueron detectados por inmunohistoquímica, desde los 7 dpi en macrófagos septales, alveolares e intravasculares del pulmón. Del mismo modo, macrófagos alveolares obtenidos por lavado broncoalveolar fueron positivos a antígenos a los 7, 14 y 21 dpi (Figura 3). A su vez, macrófagos positivos se identificaron en linfonódulos retrofaríngeos y medistínicos, aunque en menor intensidad que en tonsilas y bazo (Ramírez *et al.*, 2003; Malinarich *et al.*, 2004; Quezada *et al.*, 2005). Por otra parte, el virus fue detectado, a través de RT-PCR, en suero desde todos los cerdos inoculados a los 7 y 14 dpi; sin embargo, un cerdo fue negativo a los 21 dpi. Adicionalmente el virus fue detectado desde muestras nasales sólo en 6 de 9 animales a los 7 dpi. A su vez, se detectó seroconversión en 3 de 6 animales a los 14 dpi, y en todos los cerdos a los 21 dpi, utilizando test de ELISA (Sandoval, 2004; Ramírez *et al.*, 2004b).

Estos estudios han permitido demostrar de cierta forma que el cuadro corresponde a una infección multisistémica; sin embargo, la intensidad leve e inconstante de las lesiones macroscópicas y microscópicas sugieren que el aislado chileno del PRRSV sería de baja virulencia, si se comparan con otros estudios realizados por varios autores con aislados

FIGURA 2
MÚLTIPLES CUERPOS APOPTÓTICOS (FLECHAS) Y UNA CÉLULA EN MITOSIS
EN LA ZONA PERIFOLICULAR DEL LINFONÓDULO MEDIASTÍNICO DE UN CERDO
INOCULADO CON EL AISLADO CHILENO DEL VIRUS PRRS Y SACRIFICADO
A LOS 21 DPI. HEMATOXILINA Y EOSINA. 1000X

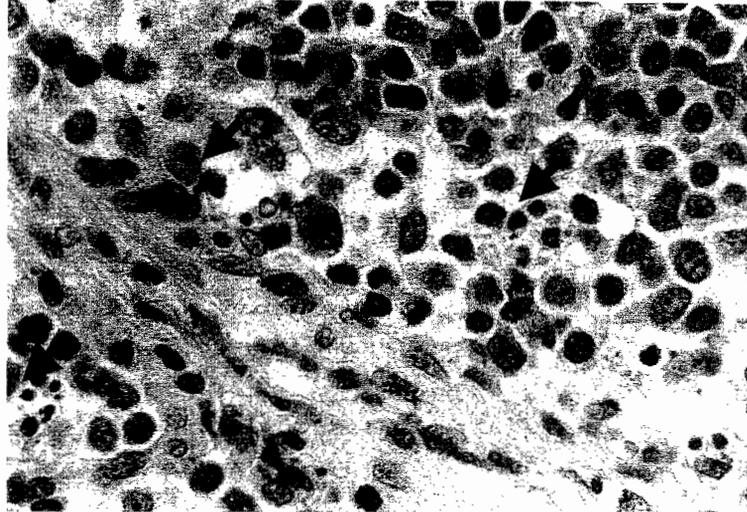
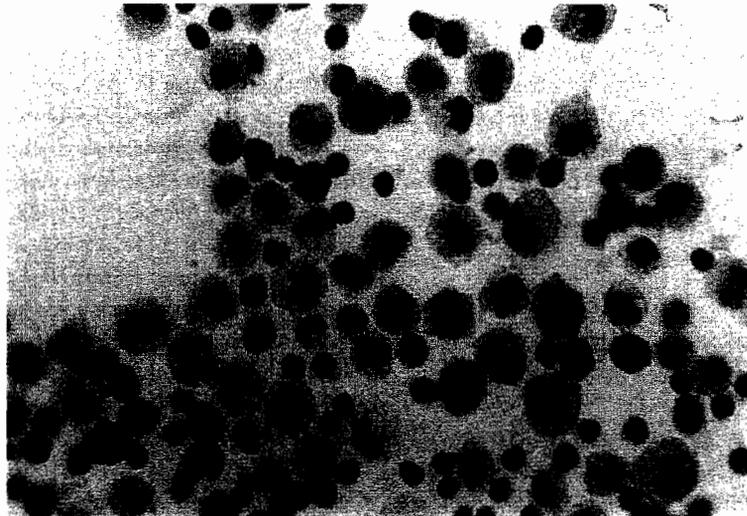


FIGURA 3
MACRÓFAGOS ALVEOLARES OBTENIDOS A TRAVÉS DE LAVADO
BRONCOALVEOLAR DE UN CERDO INOCULADO CON EL AISLADO CHILENO,
E INMUNOTEÑIDOS CON ANTICUERPO SDOW-17. COMPLEJO ABC,
CONTRATEÑIDO CON HEMATOXILINA. 1000X



de mayor virulencia (Collins *et al.*, 1992; Rossow *et al.*, 1995; Rossow *et al.*, 1999; Halbur *et al.*, 1995b; Halbur *et al.*, 1996b). Sin embargo, esto resulta ser sólo un primer paso en la caracterización del virus en nuestro país.

6.3. MEDIDAS DE CONTROL Y ERRADICACIÓN

En Chile, de acuerdo a la evaluación general que se realizó, se determinó que existe una alta factibilidad técnica de lograr la erradicación de la en-

fermedad. El primer paso que se dio fue el control de la enfermedad, permitiendo así la estabilización de los planteles infectados. Con este fin, se implementó el modelo propuesto por Torremorell y Christianson (2002), el cual busca obtener una población endémica de reproductores donde todos los animales hayan sido infectados previamente y posteriormente recuperados de la infección. Se ha demostrado que las infecciones previas con el virus producen inmunidad protectora contra la reinfección con el mismo aislado (Lager *et al.*, 1997) y, bajo este concepto, se han implementado programas de aclimatación de las chanchillas de reemplazo, las que son infectadas a una edad temprana utilizando la cepa viral presente en el plantel, y posteriormente se introducen a la granja una vez que se hayan recuperado de la infección, es decir, no eliminan el virus y no son capaces de transmitir la enfermedad a cerdos susceptibles, lo cual implica un monitoreo serológico seriado para determinar el momento en el cual los cerdos se han recuperado. Los pasos que siguen son el cierre del plantel al ingreso de animales de reemplazo por un periodo de tiempo no menor a los 6 meses con el fin de eliminar la recirculación viral, y posteriormente introducir reemplazos negativos, previa constancia que no existen virus circulando, y finalmente se elimina el virus de la línea de producción despoilando las recrias y engordas e instaurando un vacío sanitario de al menos 3 meses (Torremorell y Christianson, 2002).

En Chile se ha utilizado, como metodología de aclimatación de hembras, lechones como fuente de virus tomando como base investigaciones y recomendaciones extranjeras, considerando que en lechones de 4 a 12 semanas de vida es donde se produce mayor recirculación viral y, por lo tanto, son animales que poseen mayores posibilidades de infectar cerdos susceptibles. Bajo este concepto, actualmente se encuentra en ejecución un nuevo proyecto de investigación a cargo del Doctor Manuel Quezada Orellana, de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Concepción que tiene como principal objetivo estudiar las vías de excreción del PRRSV en cerdos inoculados con el aislado nacional y la posibilidad de transmisión de la enfermedad a grupos de cerdos susceptibles, con el fin de implementar un modelo de aclimatación más eficiente y mejorar los programas de control y erradicación de la enfermedad.

REFERENCIAS

- ALBINA, E., Y. LEFORBAN, T. BARON, J.P. DURAN, P. VANNIER. 1992. An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Ann. Rech. Vet.* 23: 167-176.
- ALBINA E.F., R. MADEC, J. CARIOLET, J. TORSIÓN. 1994. Immune response and persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in infected pigs and farm units. *Vet. Rec.* 134: 567-573.
- AMASS, S.F., G. W. STEVENSON, CH. ANDERSON, L.A. GROTE, C. DOWELL, B.D. VYVERBERG, CH. KANTIZ, D. RANGLAND. 2000. Investigation of people as mechanical vectors for porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Swine Health Prod.* 8 (4): 161-166.
- BENFIELD D.A., E. NELSON, J.E. COLLINS, L. HARRIS, S.M. GOYAL, D. ROBISON, W.T. CHRISTIANSON, R.B. MORRISON, D. GORCYCA, D. CHLADEK. 1992. Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). *J. Vet. Diagn. Invest.* 4(2): 127-133.
- BIERK, M.D., S.A. DEE, K.D. ROSSOW, S. OTAKE, J.E. COLLINS, T.W. MOLITOR. 2001. Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from persistently infected sows to contact controls. *Can. J. Vet. Res.* 65: 261-266.
- BLOEMRAAD, M., E.P. DE KLUIJVER, A. PETERSEN, G. BURKHARDT, G. WENSVOORT. 1994. Porcine reproductive and respiratory syndrome: temperature and pH stability of Lelystad virus and its survival in tissue specimens from viraemic pigs. *Vet. Microbiol.* 42: 361-371.
- BROCKMEIER S.L., K.M. LAGER. 2002. Experimental airborne transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Bordetella bronchiseptica*. *Vet. Microbiol.* 89: 267-275
- CARVALHO L.F.O.S., J. SEGALLES, C. PIUOAN. 1997. Effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on subsequent *Pasteurella multocida* challenge in pigs. *Vet. Microbiol.* 55: 241-246.
- CAVANAGH, D. 1997. *Nidovirales*: a new order comprising *Coronaviridae* and *Arteriviridae*. *Arch. Virol.* 142(3): 629-633.
- CHEON D., C. CHAE. 2000. Comparison of virus isolation, reverse transcription-polymerase chain reaction, immunohistochemistry, and in situ hybridization for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from naturally aborted fetuses and stillborn piglets. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12(6): 582-587.
- CHO, H.J., B. MCNAB, C. DUBUC, L. JORDAN, A. AFSHAR, R. MAGAR, K. EERNISS. 1997. Comparative study of serological methods for the detection of antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can. J. Vet. Res.* 61: 161-166.
- CHRISTIANSON, W.T., J.E. COLLINS, D.A. BENFIELD, L. HARRIS, D.E. GORCYCA, D.W. CHLADEK, R.B. MORRISON, H.S. JOO. 1992. Experimental reproduction of swine infertility and respiratory syndrome in pregnant sows. *Am. J. Vet. Res.* 53(4): 485-488.
- CHRISTOPHER-HENNINGS J., E.A. NELSON, R.J. HINES. 1995(a). Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in serum and semen of adult boars. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7: 456-464.
- CHRISTOPHER-HENNINGS, J.C., E.A. NELSON, J.K. NELSON, R.J. HINES, S.L. SWENSON, H.T. HILL, J.J. ZIMMERMAN, J.B.

- KATZ, M.J. YAEGER, C.C. CHASE, D.A. BENFIELD. 1995(b). Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boar semen by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33 (7): 1730-1734.
- CHUNG, H.K., CH. CHOI, J. KIM, CH. CHAE. 2002. Detection and differentiation of North American and European genotypes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by multiplex reverse transcription-nested polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.* 14: 56-60.
- COLLINS J. E., D.A. BENFIELD, W.T. CHRISTIANSON, L. HARRIS, J.C. HENNINGS, D.P. SHAW, S.M. GOYAL, S. MCCULLOUGH, R.B. MORRISON, H.S. JOO. 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. Diagn. Invest.* 4(2): 117-126.
- COOPER V.L., R.A. HESSE, A.R. DOSTER. 1997. Renal lesions associated with experimental porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9: 198-201.
- DEA, S., R. BILODEAU, R. ATHANASSIUS, R.A. SAUVAGEAU, G.P. MARTINEAU. 1992. PRRS syndrome in Quebec: isolation of a virus serologically related to Lelystad virus. *Vet. Rec.* 130: 167.
- DEE S., J. DEEN, C. PIJOAN. 2004. Evaluation of 4 intervention strategies to prevent the mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can. J. Vet. Res.* 68(1): 19-26.
- DEE S. A., J. DEEN, L. JACOBSON, K.D. ROSSOW, C. MAHLUM, C. PIJOAN. 2005. Laboratory model to evaluate the role of aerosols in the transport of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Rec.* 156: 501-504.
- DONE, S.H., D.J. PATON. 1995. Porcine reproductive and respiratory syndrome: Clinical disease, pathology and immunosuppression. *Vet. Rec.* 136: 32-35.
- ELLIS J., E. CLARK, D. HAINES, K. WEST, S. KRAKOWKA, S. KENNEDY, G.M. ALLAN. 2004. Porcine circovirus-2 and concurrent infections in the field. *Vet. Microbiol.* 98(2): 159-163.
- FENG, W. H., S.M. LASTER, M. TOMKINS, T. BROWN, J.S. XU, C. ALTIER, W. GÓMEZ, D. BANFIELD, M. B. MCCAW. 2001. In utero infection by porcine reproductive and respiratory syndrome virus is sufficient to increase susceptibility of piglets to challenge by *Streptococcus suis* type II. *J. Virol.* 75 (10): 4889-4895.
- FENG, W.H., M.B. TOMKINS, J.-S. XU, H.-X. ZHANG, M.B. MCCAW. 2003. Analysis of constitutive cytokine expression by pigs infected in-utero with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 94: 35-45.
- GRADIL, C., C. DUBUC, M.D. EAGLESOME. 1996. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: seminal transmission. *Vet. Rec.* 138: 521-522.
- GUARINO H., S.M. GOYAL, M.P. MURTAUGH, R.B. MORRISON, V. KAPUR. 1999. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by reverse transcription-polymerase chain reaction using different regions of the viral genome. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11(1): 27-33.
- HALBUR, P.G., L.D. MILLER, P.S. PAUL, X.J. MENG, E.L. HUFFMAN, J.J. ANDREWS. 1995(a). Immunohistochemical identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antigen in the heart and lymphoid system of three-week-old calostrum-deprived pigs. *Vet. Pathol.* 32: 200-204.
- HALBUR, P.G., P.S. PAUL, M.L. FREY, J. LANDGRAF, K. EERNISSE, X.J. MENG, M.A. LUM, J.J. ANDREWS, J.A. RATHJE. 1995(b). Comparison of the pathogenicity of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. *Vet. Pathol.* 32 (6): 648-660.
- HALBUR, P.G., P.S. PAUL, M.L. FREY, J. LANDGRAF, K. EERNISSE, X.J. MENG, J.J. ANDREWS, M.A. LUM, J.A. RATHJE. 1996(a). Comparison of the antigen distribution of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. *Vet. Pathol.* 33(2): 159-170.
- HALBUR, P.G., P.S. PAUL, X.J. MENG, M.A. LUM, J.J. ANDREWS, J.A. RATHJE. 1996(b). Comparative pathogenicity of nine US porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRSV) isolates in a five-week-old cesarean-derived, calostrum-deprived pig model. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8: 11-20.
- HALBUR, P.G., F.J. PALLARÉS, J.A. RATHJE, R. EVANS, W.A. HAGEMOSER, P.S. PAUL, X.J. MENG. 2002. Effects of different US isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) on blood and bone marrow parameters of experimentally infected pigs. *Vet. Rec.* 151: 344-348.
- HORTER DC, R.M. POGRANICHNIY, C.C. CHANG, R.B. EVANS, K.J. YOON, J.J. ZIMMERMAN. 2002. Characterization of the carrier state in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Vet. Microbiol.* 86(3): 213-228.
- KIM, H.S., J. KWANG, I.J. YOON, H.S. JOO, M. L. FREY. 1993. Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. *Arch. Virol.* 133: 477-483.
- KRISTENSEN C.S., A. BØTNER, H. TAKAI, J.P. NIELSEN, S.E. JORSAL. 2004. Experimental airborne transmission of PRRS virus. *Vet. Microbiol.* 99: 197-202.
- LABARQUE, G., S. VAN GUCHT, H. NAUWYNCK, K. VAN REETH, M. PENSART. 2003. Apoptosis in the lungs of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and associations with the production of apoptogenic cytokines. *Vet. Res.* 34(3): 249-260.
- LAGER K.M., L. MENGELING. 1995. Pathogenesis of in utero infection in porcine fetuses with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can. J. Vet. Res.* 59: 187-192.
- LAGER K.M., W.L. MENGELING, S.L. BROCKMEIER. 1997. Duration of homologous porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pregnant swine. *Vet. Microbiol.* 58: 127-133.
- MALINARICH F., C. LECOCQ, F. OSORIO, A. RUIZ, M. QUEZADA. 2004. Comportamiento de los macrófagos pulmonares en cerdos inoculados con el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino. IV Reunión Argentina de Patología Veterinaria. La Plata, Argentina.
- MATHIU, C., M. ROJAS, L. CERDA, A. GARCÍA. 2000. Detección de virus PRRS en Chile mediante la técnica de IFD y RT-PCR. XI Congreso de Medicina Veterinaria, Santiago, Chile.
- MENG X. J., P. S. PAUL, P. G. HALBUR, M. A. LUM. 1996. Characterization of high virulence U.S. isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a continuous cell line ATCC CRL11171. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8: 374-381.
- MENG X. J., P.S. PAUL, P.G. HALBUR, M.A. LUM. 1995. Phylogenetic analyses of the putative M (ORF6) and N (ORF7) genes of porcine reproductive and respiratory syndrome vi-

- rus (PRRSV): implications for the existence of two genotypes of PRRSV in USA and Europe. *Arch. Virol.* 140: 745-755.
- MENGLING, W.L., K.M. LAGER, A.C. VORWALD. 1995. Diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Vet. Diag. Invest.* 7: 3-16.
- MEULENBERG, J.J.M., M.M. HULST, E.J. DE MEIJER, P.L.J. M. MOONEN, A. DEN BESTEN, E.P. DE KLUYER, G. WENSVOORT, R.J.M. MOORMAN. 1993. Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS) is related to LDV and EAV. *Virology* 206: 155-163.
- MOLITOR, T.W., E.M. BAUTISTA, C.S. CHOI. 1997. Immunity to PRRSV: Double-edged sword. *Vet. Microbiol.* 55: 265-276.
- NELSON, E.A., J. CHRISTOPHER-HENNINGS, T. DREW, G. WENSVOORT, J.E. COLLINS, D.A. BENFIELD. 1993. Differentiation of US and European isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 31: 3184-3189.
- NIELSEN, J., A. BØTNER. 1997. Hematological and immunological parameters of 41/2 month old pigs infected with PRRS virus. *Vet. Microbiol.* 55: 289-294.
- NODELIJK G. 2002. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) with special reference to clinical aspects and diagnosis: a review. *Vet. Q.* 24(2): 95-100.
- NODELIJK G., G. WENSVOORT, B. KROESE, L. VAN LEENGOED, E. COLIJN E., J. VERHEIJDENL. 1996. Comparison of a commercial ELISA and an immunoperoxidase monolayer assay to detect antibodies against porcine respiratory and reproductive syndrome virus. *Vet. Microbiol.* 49: 285-295.
- OIE. Organización Mundial de Salud Animal. 2004. Mundo/Síndrome Disgénésico y Respiratorio Porcino. Situación Zoonosanitaria Plurianual [en línea]. http://www.oie.int/hs2/sit_mald.freq-pl.asp?c_cont=6&c_mald=825 [Consulta 1 de Abril 2005].
- OTAKE, S., S.A. DEE, K.D. ROSSOW, H.S. JOO, J. DEEN, T.W. MOLITOR, C. PUJOAN. 2002(a). Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by needles. *Vet. Rec.* 150: 114-115.
- OTAKE, S., S.A. DEE, K. D. ROSSOW, J. DEEN, H.S. JOO, T.W. MOLITOR, C. PUJOAN. 2002(b). Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by fomites (boot and coveralls). *J. Swine Health Prod.* 10 (2): 59-65.
- OTAKE, S., S.A. DEE, K.D. ROSSOW, R.D. MOON, C. PUJOAN. 2002(c). Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by mosquitoes, *Aedes vexans* (Meigen). *Can. J. Vet. Res.* 66(3): 191-195.
- OTAKE, S., S.A. DEE, L. JACOBSON, M. TORREMORELL, C. PUJOAN. 2002(d). Evaluation of aerosol transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus under controlled field conditions. *Vet. Rec.* 150: 804-808.
- OTAKE, S., S.A. DEE, R.D. MOON, K.D. ROSSOW, C. TRINCADO, M. FARHAM, C. PUJOAN. 2003(a). Survival of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in houseflies. *Can. J. Vet. Res.* 67: 198-203.
- OTAKE, S., S.A. DEE, K.D. ROSSOW, R.D. MOON, C. TRINCADO, C. PUJOAN. 2003(b). Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by houseflies (*Musca domestica*). *Vet. Rec.* 152: 73-76.
- PUJOAN C., G. SOLANO, J. SEGALÉS. 1994. PRRS virus and secondary disease. Proceedings of the Allen D. Leman Swine Conference, pp. 225-226.
- PLAGEMANN P.G. W. 2003. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: origin hypothesis. *Emerging Infectious Diseases.* 9(8): 903-908.
- POL, J.M. A., J.E. VAN DIJK, G. WENSVOORT, C. TERPSTRA. 1991. Pathological, ultrastructural, and immunohistochemical changes caused by Lelystad virus in experimentally induced infections of mystery swine disease (synonym: porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS)). *Vet. Q.* 13 (3): 137-143.
- POL, J.M.A., F. WAGENAAR, J.E.G. REUS. 1997a. Comparative morphogenesis of three PRRS virus strains. *Vet. Microbiol.* 55: 203-208.
- POL J.M.A., L.A.M.G. VAN LEENGOED, N. STOCKHOFF, G. KOK, G. WENSVOORT. 1997b. Dual infections of PRRSV/influenza or PRRSV/*Actinobacillus pleuropneumoniae* in the respiratory tract. *Vet. Microbiol.* 55: 259-264.
- QUEZADA M., F. VARAS, A. RUIZ, A. ISLAS, N. DÍAZ, C. LECOCQ. 2005. Detección Inmunohistoquímica del Antígeno del Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo (vPRRS) en cerdos Inoculados. *Arch. Med. Vet.* 34(2): 183-195.
- RAMÍREZ E. F. 2003. Características hematológicas y patológicas de cerdos inoculados con el aislado nacional del virus síndrome respiratorio y reproductivo porcino. Memoria de Título Med. Vet. Univ. Concepción Fac. Med. Vet. Chillán, Chile.
- RAMÍREZ E., N. DÍAZ, A. ISLAS, A. RUIZ, M. QUEZADA. 2003. Lesion and distribution of PRRS virus experimentally inoculated swine with the chilean isolated, a preliminary study. 2003 Allen D. Leman Swine Conference. Research Abstracts. 30: 13.
- RAMÍREZ E., L. CARRASCO, A. RUIZ, A. ISLAS, M. QUEZADA. 2004a. Hallazgos hematológicos y anatomopatológicos en pulmón de cerdos inoculados con el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino. IV Reunión Argentina de Patología Veterinaria, La Plata, Argentina.
- RAMÍREZ E., D. SANDOVAL, N. DÍAZ, A. GARCÍA, A. RUIZ. 2004b. Pathologic study of the chilean PRRS virus isolated in experimentally infected animals. Proceedings of the 18th IPVS Congress. 1: 45.
- ROSSOW K.D., E.M. BAUTISTA, S.M. GOYAL, T.W. MOLITOR, M.P. MURTAUGH, R.B. MORRISON, D.A. BENFIELD, J.E. COLLINS. 1994. Experimental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in one-, four-, and 10-week-old pigs. *J. Vet. Diag. Invest.* 6 (1): 3-12.
- ROSSOW, K.D., J.E. COLLINS, S.M. GOYAL, E.A. NELSON, J. CHRISTOPHER-HENNINGS, D.A. BENFIELD. 1995. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in gnotobiotic pigs. *Vet. Pathol.* 32: 361-373.
- ROSSOW K.D., D.A. BENFIELD, S.M. GOYAL, E.A. NELSON, J. CHRISTOPHER-HENNINGS, J.E. COLLINS. 1996. Chronological immunohistochemical detection and localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in gnotobiotic pigs. *Vet. Pathol.* 33: 551-556.
- ROSSOW, K.D. 1998. Porcine reproductive and respiratory syndrome. *Vet. Pathol.* 35: 1-20.
- ROSSOW, K.D., J.L. SHIVERS, P.E. YESKE, D.D. POLSON, R.R. ROWLAND, S.R. LAWSON, M.P. MURTAUGH, E.A. NELSON, J.E. COLLINS. 1999. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in neonatal pigs characterized by marked neurovirulence. *Vet. Rec.* 144: 444-448.
- RUIZ A., L. CUEVAS, J. NARANJO. 2003. Chile: Program to eradicate PRRS virus. pp 221-222 *In: J. Zimmerman and K. J.*

- Yoon (Ed.) 2003 PRRS Compendium (2nd ed). National Pork Board. Iowa, U.S.A.
- SANDOVAL D. A. 2004. Detección del virus PRRS y anticuerpos circulantes en cerdos inoculados experimentalmente con un aislado nacional. Memoria de Título Med. Vet. Univ. Concepción Fac. Med. Vet. Chillán, Chile.
- SCHURRER J.A., S.A. DEE, R.D. MOON, K.D. ROSSOW, C. MAHLUM, E. MONDACA, S. OTAKE, E. FANO, J.E. COLLINS, C. PIJOAN. 2004. Spatial dispersal of porcine reproductive and respiratory syndrome-contaminated flies after contact with experimentally infected pigs. *AJVR* 65(9): 1284-1292.
- SHIMZU M., S. YAMADA, Y. MURAKAMI, T. KOBAYASHI, K. MITANI, N. ITO, M. KUDO, K. KIMURA and M. KOBAYASHI. 1994. Isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus from Heko-Heko disease of pigs. *J. Vet. Med. Sci.* 56(2): 389-391.
- SOLANO G.I., J. SEGALÉS, J.E. COLLINS, T.W. MOLITOR, C. PIJOAN. 1997. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) interaction with *Haemophilus parasuis*. *Vet. Microbiol.* 55: 247-257.
- SUÁREZ, P., R. ZARDOYA, C. PRIETO, A. SOLANA, E. TABARES, J.M. BAUTISTA, J.M. CASTRO. 1994. Direct detection of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus by reverse polymerase chain reaction (RT-PCR). *Arch. Virol.* 135: 89-99.
- SUÁREZ, P. 2000. Ultrastructural pathogenesis of the PRRS virus. *Vet. Res.* 31: 47-55.
- SUÁREZ P., M. DÍAZ GUERRA, C. PRIETO, M. ESTEBAN, J.M. CASTRO, A. NIETO, J. ORTÍN. 1996. Open reading frame 5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus as a cause of virus-induced apoptosis. *J. Virol.* 70: 2876-2882.
- SUR J.H., V.L. COOPER, J.A. GALEOTA, R.A. HESSE, A.R. DOSTER, F.A. OSORIO. 1996. In vivo detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus RNA by in situ hybridization at different times postinfection. *J. Clin. Microbiol.* 34(9): 2280-2286.
- SUR J.H., A.R. DOSTER, J.S. CHRISTIAN, J.A. GALEOTA, R.W. WILLS, J.J. ZIMMERMAN, F.A. OSORIO. 1997. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replicates in testicular germ cells, alters spermatogenesis, and induces germ cell death by apoptosis. *J. Virol.* 71(12): 9170-9179.
- SUR J.H., A.R. DOSTER, F.A. OSORIO. 1998. Apoptosis induced in vivo during acute infection by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Pathol.* 35 (6): 506-514.
- SWENSON S.L., H.T. HILL, J.J. ZIMMERMAN, L.E. EVANS, J.G. LANDGRAF, R.W. WILLS, T.P. SANDERSON, M.J. MCGINLEY, A.K. BREVIK, D.K. CISZEWSKY, M.L. FREY 1994. Excretion of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen after experimentally induced infection in boars. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 204: 1943-1948.
- THACKER E., P. HALBUR, R.F. ROSS, B. THANAWONGNUWECH, B.J. THACKER. 1999. *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia. *J. Clin. Microbiol.* 37: 620-627.
- TERPSTRA C., G. WENSVOORT, J.M. POL. 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(3): 131-136.
- THANAWONGNUWECH R., E.L. THACKER and P.G. HALBUR. 1997. Effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) (isolate ATCC VR-2385) infection on bactericidal activity on porcine intravascular macrophages (PIMs): in vitro comparisons with pulmonary alveolar macrophages (PAMs). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 59: 323-335.
- TORREMORELL, M., C. PIJOAN, K. JANNI, R. WALKER, H.S. JOO. 1997. Airborne transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in nursery pigs. *Am. J. Vet. Res.* 58: 828-832.
- TORREMORELL M., W.T. CHRISTIANSON. 2002. PRRS Eradication by Herd Closure. *Advances in Pork Production.* 13: 169-176.
- TRINCADO C., S. DEE, L. JACOBSON, S. OTAKE, K. ROSSOW, C. PIJOAN. 2004(a). Attempts to transmit porcine reproductive and respiratory syndrome virus by aerosols under controlled field conditions. *Vet. Rec.* 154(10): 294-297.
- TRINCADO C., S. DEE, K. ROSSOW, D. HALVORSON, C. PIJOAN. 2004(b). Evaluation of the role of mallard ducks as vectors of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Rec.* 154(8): 233-237.
- VAN DER LINDEN I.F., E.M. VAN DER LINDE BRIL, J.J. VOERMANS, P.A. VAN RIJN, J.M. POL, R. MARTIN, P.J. STEVERINK. 2003. Oral transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by muscle of experimentally infected pigs. *Vet. Microbiol.* 97(1-2): 45-54.
- WAGSTROM E.A., C.C. CHANG, K.J. YOON, J.J. ZIMMERMAN. 2001. Shedding of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in mammary secretions of sows. *Am. J. Vet. Res.* 62: 1876-1880.
- WENSVOORT G., C. TERPSTRA, J.M. POL, E.A. TER LAAK, M. BLOEMRAAD, E.P. DE KLUYVER, C. KRAGTEN, L. VAN BUITEN, A. DEN BESTEN, F. WAGENAAR. 1991. Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet. Q.* 13(3): 121-30.
- WILLS R.W., J.J. ZIMMERMAN, L.W. SWENSON, L.J. HOFFMAN, M.J. MCGINLEY, H.T. HILL, K.B. PLATT. 1997a. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: Routes of excretion. *Vet. Microbiol.* 57: 69-81.
- WILLS R., J. ZIMMERMAN, K. YOON, S. SWENSON, M. MCGINLEY, H. HILL, K. PLATT, J. CHRISTOPHER-HENNINGS, E. NELSON. 1997b. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a persistent infection. *Vet Microbiol.* (1-4): 231-40.
- WILLS R.W., J.J. ZIMMERMAN, S.L. SWENSON, K.J. YOON, H.T. HILL, D.S. BUNDY, M.J. MCGINLEY. 1997c. Transmission of PRRSV by direct, close, or indirect contact. *Swine Health and Production.* 5(6): 213-218.
- WILLS R.W., J.T. GRAY, P. J. FEDORKA-CRAY, K.L. YOON, S. LADELY, J.J. ZIMMERMAN. 2000. Synergism between porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and *Salmonella choleraesuis* in swine. *Vet. Microbiol.* 71: 177-192.
- WILLS R. W., A.R. DOSTER, J.A. GALEOTA, J.H. SUR, F.A. OSORIO. 2003. Duration of infection and proportion of pigs persistently infected with Porcine Reproductive and Respiratory syndrome virus. *J. Clin. Microbiol.* 4(1): 58-62.
- YAEGER M.J., T. PRIEVE, J. COLLINS, J. CHRISTOPHER-HENNING, E. NELSON, D. BENFIELD. 1993. Evidence for the transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in boar semen. *Swine Health and Production* 1(4): 5-8.
- YANG L., K.J. YOON, Y. LI, J.H. LEE, J.J. ZIMMERMAN, M.L. FREY, K.M. HARMON, K.B. PLATT. 1999. Antigenic and genetic variations of the 15 kD nucleocapsid protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates. *Arch. Virol.* 144(3): 525-546.

- YOON, K.J., J. CHRISTOPHER-HENNING, E.A. NELSON. 2003. Diagnosis. pp. 59-74. *In: J. Zimmerman and K.J. Yoon (Ed.) 2003 PRRS Compendium (2nd ed).* National Pork Board. Iowa, U.S.A.
- YOON K.J., H.S. JOO, W.T. CHRISTIANSON, R.B. MORRISON, G.D. DIAL. 1993. Persistent and contact infection in nursery pigs inoculated experimentally infected with of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Swine Health and Production.* 1(4): 5-8.
- YOON K.J., J.J. ZIMMERMAN, C.C. CHANG, S. CANCEL-TIRADO, K.M. HARMON, M.J. MCGINLEY. 1999. Effect of challenge dose and route on porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in young swine. *Vet. Res.* 30(6): 629-638.
- YOON, K. J., J.J. ZIMMERMAN, S. L. SWENSON, M.J. MCGINLEY, K.A. EERNISSE, A. BREVIK, L.L. RHINEHART, M.L. FREY, H.T. HILL, K.B. PLATT. 1995. Characterization of the humoral immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7: 305-312.
- ZIMMERMAN J., T. SANDERSON, K. EERNISSE, H.T. HILL, M.L. FREY. 1992. Transmission of SIRS virus from convalescent animals to commingled penmates under experimental conditions. *Am. Assoc. Swine. Pract. Newsl.* (4): 27.
- ZIMMERMAN J.J. 2003. *Epidemiology and Ecology.* 2003. pp 27-50. *In: J. Zimmerman and K. J. Yoon (Ed.) 2003 PRRS Compendium (2nd ed).* National Pork Board. Iowa, U.S.A.
- ZIMMERMAN J.J., K.J. YOON, E.C. PIRTLE, R.W. WILLS, T.J. SANDERSON, M.J. MCGINLEY. 1997. Studies of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection in avian species. *Vet. Microbiol.* 55(1-4): 329-336.