



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**IDENTIFICACIÓN Y VIABILIDAD DEL VIRUS DEL
SÍNDROME REPRODUCTIVO Y RESPIRATORIO
PORCINO EN CARNES DE CERDO IMPORTADAS**

PATRICIA ALEJANDRA ARAVENA PAVEZ

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

PROFESOR GUÍA: VÍCTOR MANUEL NEIRA RAMÍREZ
Financiamiento Proyecto FONDEF ID14110201
ASPROCER, Laboratorio de Virología Animal

SANTIAGO, CHILE
2018



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**IDENTIFICACIÓN Y VIABILIDAD DEL VIRUS DEL
SÍNDROME REPRODUCTIVO Y RESPIRATORIO
PORCINO EN CARNES DE CERDO IMPORTADAS**

PATRICIA ALEJANDRA ARAVENA PAVEZ

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

Nota Final

Profesor Guía: Víctor Neira Ramírez

Profesora Correctora: Javiera Cornejo Kelly

Profesor Corrector: Patricio Retamal Merino

SANTIAGO, CHILE
2018

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi Profesor guía, el Dr. Víctor Neira, por ayudarme en la realización de esta memoria, por su confianza y por estar siempre disponible para resolver mis dudas y pendiente del trabajo que se estaba realizando. También y junto al Dr. Neira, agradezco al equipo del Laboratorio de Virología, Rodrigo, Victoria y Juan, por ayudarme tanto prácticamente con las muestras de la memoria, como también, por su buena disposición para ayudarme en los momentos que lo necesité.

Por último, quiero agradecer a mi familia y amigos, por todo su apoyo. Especialmente a mis papás, por darme la posibilidad y todas las facilidades para estudiar y poder desarrollarme como persona y profesional. Y a mis hermanos mayores, por sus consejos, por siempre estar tan preocupados, y por ser un ejemplo para mí.

¡Gracias a todos!

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
Etiología.....	2
Patogenia.....	3
Manifestación clínica.....	3
Transmisión.....	4
Contexto nacional.....	5
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	6
MATERIALES Y MÉTODOS	7
Obtención de muestras.....	7
Procesamiento de las muestras.....	8
RT-PCR en tiempo real.....	8
Aislamiento y titulación viral.....	9
Medidas de bioseguridad.....	9
Análisis de resultados.....	10
RESULTADOS	11
RT-PCR en tiempo real.....	11
Aislamiento viral.....	13
DISCUSIÓN	14
Detección de material genético mediante RT-PCR en tiempo real.....	14
Determinación de viabilidad mediante aislamiento viral.....	15
Origen de las muestras cárnicas.....	17
Carne como fuente de transmisión de enfermedades.....	17
CONCLUSIONES	20

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1	11
----------------------	----

Resultados RT-PCR en tiempo real.

TABLA 2	12
----------------------	----

Estadística descriptiva de los resultados de RT-PCR en tiempo real considerando todos los resultados.

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	11
-----------------------	----

Valores de Ct de cada una de las 72 muestras distribuidas en los 6 muestreos.

FIGURA 2	12
-----------------------	----

Resultados de RT-PCR en tiempo real de muestras positivas y sospechosas.

FIGURA 3	19
-----------------------	----

Diferentes vías por las cuales se puede producir un brote de PRRS por carne contaminada con PRRSv.

RESUMEN

El síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS), es una enfermedad exclusiva del cerdo, la cual causa las mayores pérdidas económicas en la industria porcina a nivel mundial. El virus es transmitido por diferentes fuentes, principalmente a través de contacto con cerdos contaminados, semen entre otros. Una de las vías posibles de transmisión, corresponde a la transmisión oral mediante el consumo de carne de cerdo contaminada. En Chile el virus fue re-introducido en 2013, desconociéndose su forma de ingreso; sin embargo, está estrechamente relacionado con cepas de USA del 2012, identificadas durante actividades de vigilancia.

Para evaluar la posible transmisión a través de la carne, se analizaron 72 muestras de carne de cerdo importada, mediante RT-PCR en tiempo real y aislamiento viral. Seis de las 72(8%) muestras resultaron positivas a RT-PCR en tiempo real y 7(10%) sospechosas, con Ct promedio de 34,9. La muestra con el Ct más bajo fue de 33,09 y el máximo (sospechoso) 36,5. Estos resultados confirman la presencia frecuente de material genético de virus PRRS en carnes importadas. Por otro lado, en ninguna de las muestras positivas fue posible aislar el virus PRRS. Su viabilidad no pudo ser demostrada, lo pudo verse influenciado debido a problemas del aislamiento viral, ya que los cultivos fueron usualmente contaminados por bacterias presentes en la carne limitando la técnica.

Futuros estudios son necesarios para entender mejor esta vía de transmisión, una de las maneras de mejorar el estudio de viabilidad podría ser el uso de animales centinela.

Palabras clave: PRRS, carne de cerdo, importación, RT-PCR en tiempo real, aislamiento viral.

ABSTRACT

The porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS), is a mayor disease causing the highest economic losses in the pork industry worldwide. The virus only affects pigs, the main transmission sources are the infected pigs and semen. Another source of infection may be pork, by oral ingestion. In Chile PRRS virus was re-introduced in 2013. The virus is close related genetically with strains detected in USA in 2012. The introduction source is still unknown.

The goal of this study was to assess the pork as a possible source of PRRS virus. Seventy-two pork samples were tested by real time RT-PCR and viral isolation was attempted in positive samples. Six (8%) out of 72 were positive and 7 (10%) were suspect. The average of Ct values was 34,9 excluding negative samples. The lowest Ct reported was 33.09 and the highest suspect Ct value was 36.5. The PCR results indicate that RNA of PRRS virus can be frequently found in pork samples. In other hand, the viral isolation was negative in all samples tested at first passage. Therefore, the PRRS viability was not confirmed. These results may be affected by cell culture contamination by bacteria present in the pork samples. Further studies are necessary to better understand this source of contamination, to improve the assess viability the animal bioassay could be used.

Key words: PRRS, pork, importation, real time RT-PCR, viral isolation.

INTRODUCCIÓN

En Chile, la producción de carne de cerdo se posiciona como la segunda más importante en términos de volumen producido, con un total de 523 mil toneladas vara producidas en el año 2015, cifra que representó un 36% de la producción total de carnes. Sumado a esto, la industria porcina es la principal exportadora de carne del país, destinando el 55% del total producido en el 2015 para exportación (ASPROCER, s/a). La producción se concentra en la zona centro sur del país, donde la Región de O'Higgins es la que posee el mayor número de criaderos industriales y población porcina, siguiendo en orden de importancia las regiones Metropolitana, Bío-Bío, Maule, La Araucanía, Los Lagos y Valparaíso (INE, 2015).

Actualmente, Chile exporta a 60 diferentes países y está posicionado como el sexto país exportador de carne de cerdo a nivel mundial (ASPROCER, s/a). Esto se debe, junto a otras razones, a la mantención del estatus de “país libre” frente a las principales enfermedades que limitan el comercio internacional. Sin embargo, se encuentra presente una de las enfermedades de mayor importancia para la industria en el mundo, por causar grandes pérdidas productivas y económicas. El Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS) se caracteriza por producir defectos en la reproducción de las hembras porcinas y problemas respiratorios en lechones y cerdos en crecimiento (OIE, 2015a). Esta enfermedad se encuentra ampliamente distribuida en el mundo, excepto en Australia, Nueva Zelanda, Finlandia, Noruega, Suecia y Suiza (Niederwerder y Rowland, 2017).

Chile ha sido uno de los pocos países que logró llevar a cabo con éxito un plan de control y erradicación de la enfermedad entre los años 2003 y 2007, y se auto-declaró libre de PRRS ante la OIE, quien aceptó esta condición en marzo de 2013. Sin embargo, la enfermedad reaparece en octubre del 2013, esta vez causada por un nuevo virus. Debido a esto, se lanza un nuevo plan de control y erradicación de PRRS por parte del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) en el cual se trabaja desde 2014 a la actualidad (SAG, s/a). Una de las hipótesis de la reintroducción de PRRS a Chile ha sido la introducción y transmisión del virus a través de la carne importada, lo cual no ha sido completamente descartado. En este proyecto se analizarán muestras de carnes de cerdo importadas, para detectar e identificar material genético y/o presencia de virus viable de PRRS. Estos resultados ayudarán a entender de mejor manera esta posible ruta de re-introducción y transmisión.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS, por sus siglas en inglés) es una enfermedad viral caracterizada por producir cuadros clínicos reproductivos en las hembras porcinas y problemas respiratorios en lechones y cerdos en crecimiento (OIE, 2015a). Es por estos efectos, sumado a su rápida propagación, que es considerada una de las enfermedades más importantes en la industria porcina, debido al impacto productivo y económico que es capaz de producir.

Los primeros antecedentes de la enfermedad se obtuvieron en 1987, donde la aparición de una enfermedad de etiología desconocida afectaba a la producción porcina de Estados Unidos, y debido a esto, se le denominó como la “Enfermedad misteriosa del cerdo” (MSD, por sus siglas en inglés). Luego, en 1990 comenzaron a aparecer signos compatibles con la MSD en Alemania y otros países de Europa occidental donde fue adquiriendo y se hizo conocida con otros nombres como “Síndrome abortivo y respiratorio porcino (PEARS)”, “Enfermedad del cerdo de orejas azules”, “Síndrome abortivo y respiratorio epidémico”, entre otros (Christianson y Joo, 1994).

La identificación del agente etiológico, finalmente se confirmó en Holanda en el año 1991, donde fue posible aislar un virus previamente desconocido proveniente de cerdos afectados por la enfermedad, al cual se nombró como “virus Lelystad” (Wensvoort *et al.*, 1991). Poco tiempo después, se publicó el aislamiento del virus en Estados Unidos, y se denominó “virus del Síndrome respiratorio y de infertilidad porcino” (SIRS) (Collins *et al.*, 1992). Finalmente, en el año 1992 durante el Simposio Internacional sobre la enfermedad llevado a cabo en St. Paul, Minnesota, se llega al consenso de utilizar el nombre de Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS) (Christianson y Joo, 1994).

Etiología

El virus del *Síndrome reproductivo y respiratorio porcino* (PRRSv) es clasificado taxonómicamente como perteneciente al Orden *Nidovirales*, Familia *Arteriviridae* y Género *Arterivirus* (OIE, 2015a). Es un virus ARN de hebra simple con polaridad positiva, envuelto, de 50-56 nm de diámetro. El ARN vírico es de 15 kb de longitud aproximadamente y codifica para al menos 7 marcos de lectura abiertos (ORFs), donde el

ORFs 1a y 1b abarcan el 75% del genoma viral y codifican para proteínas involucradas en la replicación viral, mientras que los ORFs 2-7 codifican principalmente para proteínas estructurales (Linhares, 2013).

Existen 2 genotipos del PRRSv, el tipo 1 o variante europea- siendo su virus prototipo el “Lelystad”- y el tipo 2, norteamericano, con su virus prototipo VR 2332 (OIE, 2008). Ambos genotipos presentan una diferencia en su secuencia nucleotídica de aproximadamente un 44% (Zimmerman *et al.*, 2012). Dentro de cada genotipo existen múltiples variantes las que se agrupan en linajes.

Patogenia

La exposición de un hospedero susceptible ante el PRRSv, mediante las diversas posibles vías de transmisión (que incluyen la inhalación, ingestión, coito, inseminación artificial- a través de semen infectado, heridas y fomites), produce una infección virémica de duración aproximada de 3-5 semanas y una infección no virémica persistente en el tejido linfático incluso después de 4 meses post infección (Wills *et al.*, 2003).

La principal vía de transmisión es a través de contacto directo entre un animal infectado y uno susceptible, siendo la vía oro nasal la principal vía de ingreso del virus. La replicación viral se produce en los macrófagos locales del cornete nasal, tonsilas y pulmón, y por vía linfática alcanza los nódulos linfáticos regionales desde donde pasa a la circulación sanguínea y se distribuye al resto de los órganos (Zimmerman *et al.*, 2012).

Manifestación clínica

La manifestación clínica de la enfermedad varía de acuerdo a diferentes factores que incluyen la edad y el sexo del animal, la variante viral, el estatus sanitario del rebaño y el estado inmunitario del hospedero y rebaño (Ciacci-Zanella y Sobestiansky, 2007). Es así como la signología clínica y la severidad con que se presenta es altamente variable (Nodelijk, 2002), pudiendo ser desde una infección inaparente que no genere grandes cambios en la productividad a una enfermedad reproductiva y/o respiratoria severa (Linhares, 2013). De manera general, la fase epidémica de la infección se caracteriza por afectar a todas las etapas productivas, y en comenzar con signología inespecífica como la presentación de anorexia y letargia (Zimmerman *et al.*, 2012). En los lechones y cerdos en

crecimiento se presentan animales con temperatura rectal elevada (39-41°C), hiperpnea y disnea, hiperemia cutánea, extremidades cianóticas y disminución en la ganancia diaria de peso (Zimmerman *et al.*, 2012). La enfermedad respiratoria se complica, ya que incrementa la susceptibilidad a *Streptococcus suis* y aumenta la severidad de la infección por *Salmonella choleraesuis* e *Influenza A* (Cho y Dee, 2006; Dobrescu *et al.*, 2014). Asimismo, PRRSv puede ser potenciado a través de la infección conjunta con *Mycoplasma hyopneumoniae* y Circovirus Porcino tipo 2 (Wellenberg *et al.*, 2004; Thacker *et al.*, 1999).

Luego, 1-4 meses después del ingreso de la infección a un plantel, se comienzan a evidenciar los desórdenes reproductivos en las hembras, que incluyen abortos, nacimientos prematuros, aumento en la incidencia de fetos autolíticos, muerte fetal con o sin momificación y lechones débiles que mueren al poco tiempo luego de nacidos (Nodelijk, 2002). En los verracos, los principales signos que se presentan incluyen anorexia, letargia, falta de líbido y la reducción en la calidad del semen, debido a cambios morfológicos y en la motilidad de los espermatozoides (Prieto *et al.*, 1996).

Transmisión

El PRRSv puede ser transmitido tanto de forma vertical y horizontal. La transmisión vertical consiste en el paso del virus a través de la placenta desde una madre infectada al feto. La transmisión transplacentaria generalmente ocurre durante el último trimestre de la gestación, sin embargo también existe evidencia de algunos aislados capaces de traspasar esta barrera sólo a los 30 días de gestación (Zimmerman, 2003). Los lechones que sobreviven y nacen infectados, excretan el virus durante los primeros meses de su vida.

En cuanto a la transmisión horizontal, esta puede ser tanto de manera directa como indirecta. La forma más común de la transmisión del PRRSv, es mediante transmisión directa, por contacto estrecho entre los animales, debido a conductas tanto amistosas como agresivas a través de la exposición a fluidos corporales contaminados (Zimmerman, 2003).

La transmisión horizontal indirecta es principalmente a través de fómites, que incluyen botas, overoles, agujas, jeringas, vehículos de transporte (Cho y Dee, 2006) e insectos. Específicamente se ha demostrado la transmisión mecánica del virus por mosquitos y moscas bajo condiciones experimentales (Otake *et al.*, 2002; Otake *et al.*, 2004).

Por otro lado, la transmisión por aerosoles cumple un rol importante en la transmisión entre granjas cercanas, especialmente en áreas donde existe alta densidad de producciones porcinas. En cuanto a la distancia necesaria para que el virus pueda ser aerotransportado y permanecer infeccioso, Otake *et al.*, (2010) ha logrado establecer una distancia de 9,1 km.

Finalmente, otra de las posibles vías de transmisión que se ha estudiado es la transmisión mediante el consumo de carne de cerdo contaminada con PRRSv (Zimmerman, 2003). Un estudio preliminar demostró la presencia de ARN de PRRSv en carne y jugo de carne en 1/10 muestras, aunque no se demostró la presencia de virus viable (datos preliminares ASPROCER). Por otra parte, estudios previos, basados en el contexto norteamericano, han estipulado que tan solo el 1,9% de las carcasas faenadas serían positivas a PRRS con un título $\leq 10^3$ TCID₅₀/gr (dosis infecciosa en cultivo de tejido 50) (Alban et al., 2006; Magar and Larochelle, 2004). Sin embargo, este modo de transmisión está en constante evaluación, debido a los riesgos que implica la comercialización internacional de la carne de cerdo.

Contexto nacional

En Chile se identificó PRRS por primera vez en el año 1999 (Neira *et al.*, 2016). Después de un intenso programa de erradicación y control, el virus fue eliminado en el 2007. Luego de autoproclamarse libre, la OIE reconoció la condición de “libre de PRRSv” a Chile en Marzo del 2013. Posteriormente, en octubre del 2013, PRRS es reportado en una granja de hembras de la Región Metropolitana. El virus encontrado correspondió a un nuevo virus, diferente al anterior, por lo que se confirmó una re-introducción del patógeno. Se ha determinado que el virus corresponde a un genotipo americano, y muy cercano a PRRSv aislados en USA durante el año 2012-2013, con los cuales tienen un ancestro común (Neira *et al.*, 2015). Diversos estudios se han realizado en torno al origen del brote del 2013, aunque aún no es claro como el virus hubiera ingresado al país. En este contexto se ha sugerido como vía de ingreso, material genético (semen), productos inmunológicos (vacunas contaminadas contra otros agentes) y la carne importada. A la fecha ninguna de estas ha sido 100% descartada (Max, 2015).

HIPÓTESIS

El PRRSv se encuentra presente en carne congelada de cerdo importada.

OBJETIVO GENERAL

Detectar y determinar la viabilidad de PRRSv presente en carnes congeladas de cerdo importadas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Detectar PRRSv en carnes congeladas de cerdo importadas.
2. Determinar la viabilidad de PRRSv presente en carnes congeladas de cerdo importadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Virología Animal, del Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

Obtención de muestras

Se obtuvieron muestras de carne congelada de cerdo importada desde supermercados ubicados en la Región Metropolitana, que se seleccionaron de acuerdo a lo descrito a continuación. Previamente, se ha observado que los principales cortes de carne de cerdo importada corresponden a costillares, por lo cual, estas fueron usadas en el estudio. Asimismo, se ha determinado que la mayor parte de las carnes de cerdo importada provienen de Estados Unidos (USA) y Brasil. Debido a que este último es negativo a PRRS según la OIE, solo se considerará la obtención de muestras provenientes de USA, ya que es endémico al virus (OIE, 2015b)

Las carnes son comercializadas congeladas, selladas al vacío y contienen la fecha de faena. Además, cada carne contiene un número de lote, el cual fue utilizado en la identificación y en la selección de las muestras. Para evitar tomar dos muestras del mismo cerdo, se consideró elegir solo costillares derechos; asimismo, las muestras fueron elegidas de entre al menos 4 lotes de producción. A su vez, se recomienda obtener las muestras entre Diciembre y Marzo, época de mayor prevalencia de PRRSv en USA (Tousignant *et al.*, 2014)

El tamaño de muestra fue calculado para encontrar al menos una muestra positiva, considerando una población infinita y prevalencia del 10%. Así se estima que a lo menos 31 muestras de carne serían analizadas si se quería encontrar al menos una muestra positiva. Por lo tanto, se obtuvieron un número de muestras mayor o igual a 31 costillares. Las muestras fueron compradas e inmediatamente mantenidas en hielo para su transporte y congeladas hasta su procesamiento a -20°C.

Procesamiento de las muestras

Cada muestra fue cortada sin ser descongelada obteniéndose al menos 5 porciones de 100 gramos cada una, que fueron almacenadas a -20°C como muestras de respaldo. Para efectuar el corte de la carne, se utilizó una sierra caladora eléctrica, que fue flameada entre cada muestra.

Por otro lado, una alícuota (pieza cárnica) fue descongelada, y el jugo de carne obtenido se alícuotó en tubos de 1,5mL, obteniéndose a lo menos 10 mL de jugo de carne. El jugo de la carne correspondió a la muestra a analizar, debido a que previamente se ha determinado que es más sensible a la detección por PCR en tiempo real (Torremorell, 2015). Una alícuota fue inmediatamente procesada y el resto se conservó a -80°C como contra muestra.

RT-PCR en tiempo real

El material genético viral (ARN) fue extraído mediante el protocolo TRIzol® Reagent (Thermo Fischer Scientific Inc.) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Para la técnica de RT-PCR en tiempo real, se utilizó el kit comercial VetMAX™ NA and EU PRRSV Reagents (LifeTechnologies), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, la mezcla maestra está compuesta por: 12,5 μL de Multiplex RT-PCR Buffer, 2,5 μL de PRRSV Primer ProbeMix V2, 2,5 μL de Multiplex EnzymeMix, 0,25 μL de Xeno™ RNA Control, 0,25 μL de agua libre de nucleasas y 7 μL de ARN, para completar un total de 25 μL de reacción. El programa de termociclado fue el siguiente: transcripción inversa a 45°C por 10 min, denaturación inicial a 95°C por 10 min, y denaturación a 95°C por 15 s y alineamiento-extensión a 60°C por 45 s en 40 ciclos. Las muestras que presentaran un ciclo umbral (Ct, por sus siglas en inglés) menor a 35 fueron consideradas como positivas, según las recomendaciones del fabricante del kit.

Aquellas muestras positivas a RT-PCR fueron sometidas a aislamiento viral. A su vez, a las muestras positivas a aislamiento viral se les realizaría titulación viral. El título obtenido se consideraría la carga viral al tiempo 0 (recién descongelado).

Aislamiento y titulación viral

El aislamiento viral fue realizado en células MARC-145, que corresponden a células epiteliales derivadas de riñón de mono verde. Brevemente, las células fueron crecidas y mantenidas en botellas T75, usando medio mínimo esencial (MEM), con un 5% de suero fetal bovino (SFB) más antibióticos y antimicóticos al 1% (Penicilina/Estreptomicina y Anfotericina B). Las células se incubaron a 37°C con 5% de CO₂. Posteriormente, placas de 24 pocillos fueron preparadas usando el mismo método, y fueron inoculadas con las muestras previamente filtradas con un filtro de 0,2 µm. Las monocapas se observaron diariamente por 5 días en busca de efecto citopático (ECP) de PRRS, el cual consiste en el desprendimiento paulatino de la monocapa. Las muestras sospechosas o positivas a ECP serían sometidas a un nuevo PCR para confirmar la presencia del virus. Aquellas monocapas que presenten un Ct menor al reportado en su muestra original se considerarían como positivas al aislamiento viral, es decir en ellas existía presencia de virus viable.

Para la titulación viral, se efectuaría un procedimiento similar al de aislamiento viral. Donde monocapas de células MARC 145 serían crecidas en placas de 96 pocillos. Luego, las muestras se diluirían 6 veces en base 10 usando medio de cultivo. Posteriormente, cada muestra iba a ser inoculada en cuadruplicado, usando 100µl de dilución. Las monocapas se observarían por 5 días para identificar ECP. El título viral iba a ser calculado en dosis infectante 50/ml a través del método de Spearman y Karber (Hierholzer y Killintong, 1996).

Medidas de bioseguridad

Para desarrollar este estudio, se contempló efectuar los procedimientos bajo estrictas medidas de bioseguridad, para reducir el riesgo de contaminación y diseminación de PRRSv. A continuación, se detallan estas medidas de acuerdo a las diferentes etapas del estudio.

Para el procesamiento de las muestras: el corte de muestras se realizó en el laboratorio de Virología utilizando mechero para eliminar material cárnico infeccioso en suspensión. La sierra de corte, fue esterilizada entre usos. La muestra obtenida (jugo de carne) se extrajo y

alicuotó bajo campana de bioseguridad. Luego de la extracción del material genético, la muestra no es infecciosa.

Para el aislamiento y titulación viral: ambos procedimientos fueron realizados en dependencias del Laboratorio y Estación Cuarentenaria Lo Aguirre del SAG y/o bajo nivel de bioseguridad 2 (ATCC, s/a).

Análisis de Resultados

Los resultados son presentados de forma descriptiva y en caso de obtener muestras positivas al PCR y/o a la titulación viral, se realizarán comparaciones entre los valores de Ct y carga viral. Y finalmente, los resultados fueron ilustrados mediante gráficos y tablas.

RESULTADOS

Un total de 72 muestras fueron analizadas en el presente estudio, realizándose muestreos en 6 diferentes ocasiones, entre Febrero del 2016 y Agosto del 2017, donde se obtuvo al menos 6 muestras por evento.

RT-PCR en tiempo real

Para el análisis de los resultados de RT-PCR en tiempo real se consideraron como positivas a todas aquellas muestras que presentaran un $Ct < a 35$. De esta forma, 6 muestras resultaron positivas (8%) y 59 negativas (82%). Las 7 muestras restantes presentaron un valor de $Ct > a 35$ y $< a 40$, clasificándose como muestras sospechosas y representando un 10% del total (Tabla 1). Para la visualización gráfica de los resultados, se consideró un Ct de 40 para las muestras negativas (Figura 1).

Tabla 1- Resultados RT-PCR en tiempo real.

Resultado	Nº muestras	Porcentaje
Positivas	6	8%
Sospechosas	7	10%
Negativas	59	82%
TOTAL	72	100%

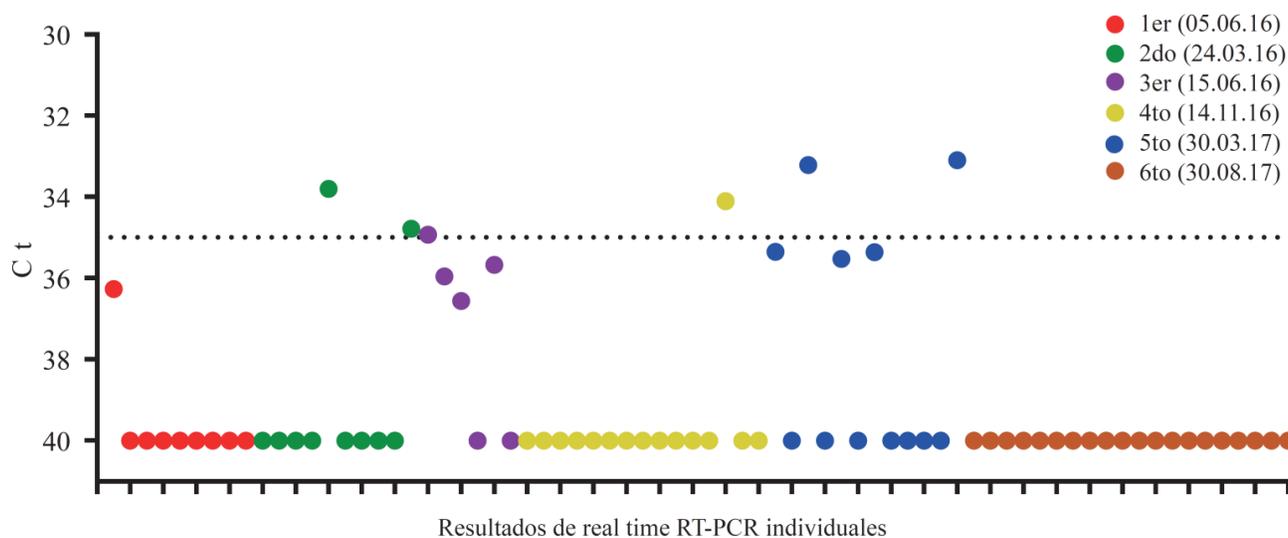


Figura 1- Valores de Ct de cada una de las 72 muestras distribuidas en los 6 muestreos.

En 4 de los 6 muestreos se logró identificar muestras positivas, y en 5 de los 6 hubo muestras que reportaron un Ct menor a 40. La estadística descriptiva obtenida considerando todas las muestras en conjunto se detalla en la Tabla 2. Destaca que el Ct más bajo obtenido correspondió a 33,09, y resultó un promedio de 39,09 considerando negativas con Ct 40. Al excluir los resultados negativos, el promedio de Ct de los diferentes muestreos fue de 34,9 y el Ct mayor considerado fue de 36,5 (Figura 2).

Tabla 2- Estadística descriptiva de los resultados de RT-PCR en tiempo real considerando todos los resultados.

Número de Muestras	72
Mínimo	33,09
25% Percentil	40
Mediana	40
75% Percentil	40
Máximo	40
Promedio	39,09
Desviación estándar	2,002
Error estándar	0,236

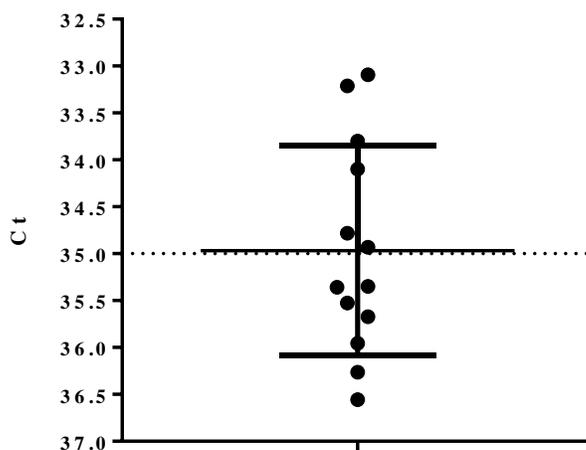


Figura 2- Resultados de RT-PCR en tiempo real de muestras positivas y sospechosas.

El detalle de los resultados obtenidos en cada uno de los 6 muestreos se describe a continuación:

- 1) El primer muestreo se realizó el 5 de Febrero del 2016, donde se analizaron 9 muestras. No se presentaron muestras positivas, 8 resultaron negativas y 1 sospechosa con un valor de Ct igual a 36,265.
- 2) En el segundo muestreo, realizado el 23 de Marzo de 2016, se analizaron 10 muestras. 2 resultaron positivas, con valores de Ct de 33,7 y 34,7, y las 8 muestras restantes negativas.
- 3) En el tercer muestreo, realizado el 15 de Junio de 2016, 6 muestras fueron analizadas, resultando 1 muestra positiva (con un Ct de 34,9), 3 muestras sospechosas y 2 negativas.
- 4) En el cuarto muestreo, realizado el 14 de Noviembre de 2016, se analizaron 15 muestras, donde resultó 1 muestra positiva (Ct de 34) y las 14 restantes negativas.
- 5) El quinto muestreo se realizó el 30 de Marzo de 2017, donde se analizaron un total de 12 muestras. 2 muestras resultaron positivas y presentaron los menores valores de Ct obtenidos en este estudio: 33,2 y 33. Además, hubo 3 muestras sospechosas y 7 negativas.
- 6) Por último, se analizaron 20 muestras en el sexto muestreo realizado el 1 de Agosto de 2017, a partir de las cuales todas resultaron negativas.

Aislamiento viral

El aislamiento viral fue intentado en las 6 muestras positivas, en dependencias del Laboratorio y Estación Cuarentenaria Lo Aguirre del SAG. Todos los cultivos fueron negativos al primer pasaje, no observándose efecto citopático (ECP) y los resultados de RT-PCR en tiempo real de los sobrenadantes también resultaron negativos. Como dificultad observada en el proceso, se observó en los cultivos contaminación bacteriana desde el segundo día de inoculación, mientras que los controles utilizados se mantuvieron negativos y limpios.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos permiten confirmar la hipótesis del presente estudio, ya que se pudo detectar la presencia de material genético de PRRSv en carnes de cerdo importadas. Sin embargo, su viabilidad no pudo ser demostrada. Por lo anterior, la discusión de este estudio abarca temas que tienen que ver con: la detección de material genético del PRRSv, y aislamiento de PRRSv a partir de muestras cárnicas para la demostración de su viabilidad. Y a la carne como fuente de transmisión de enfermedades y específicamente de PRRS.

Detección material genético de PRRSv mediante RT-PCR en tiempo real.

La posibilidad de detectar PRRSv en muestras de carne era esperable debido a la evidencia existente en estudios previos que han logrado demostrar su presencia, tanto en tejido muscular como en muestras de carne propiamente tal (Bloemraad *et al*, 1994; van der Linden *et al*, 2003; Magar y Larochele, 2004; Cano *et al*, 2007; Molina *et al*, 2009; Raymond *et al*, 2017). Sin embargo, la magnitud del porcentaje de muestras positivas del presente estudio fue superior a la mayoría de los estudios anteriormente mencionados, correspondiendo a un 8%. Esta diferencia podría ser explicada por algunos de los factores que se discuten a continuación.

En primer lugar, se puede destacar que se han realizado los mismos análisis a partir de diferentes tipos de muestra. En el caso particular de carnes de cerdo envasadas, provenientes desde plantas de procesamiento y congeladas para la posterior realización de RT-PCR y aislamiento viral, han resultado negativas en su totalidad en el pasado a ambos métodos. Sin embargo, Larochele y Magar, 1997 utilizaron homogenizados de carne, lo cual difiere con nuestro estudio donde el jugo de carne fue la muestra a analizar. La muestra de jugo de carne, de acuerdo a una comunicación personal con la Dra. Montserrat Torremorrell, sería más sensible para la detección del virus por RT-PCR, lo cual podría explicar esta diferencia. La muestra de jugo de carne, corresponde a transudado y resto de sangre de toda la pieza de carne, lo cual facilita de la detección del virus.

Magar y Larochele, 2004 analizaron las carcasas de 1.027 cerdos provenientes de 2 plantas faenadoras. En este caso, también se utilizaron homogenizados de carne para el PCR donde se obtuvo sólo un 1,9% de muestras positivas, y fue posible obtener sólo un aislado.

Además, se logró infectar a cerdos a través del consumo de estas muestras positivas a PRRSv (Magar y Laroche, 2004). Es importante recordar que, en este último estudio, se utilizaron muestras de carne fresca y se utilizó un número mayor de muestras.

En contraste a los resultados anteriores, el transudado de carne de cerdos infectados experimentalmente ha sido analizado con RT-PCR, obteniendo un 14,6% de muestras positivas (Molina *et al*, 2009). Particularmente en este estudio, los cerdos fueron observados por un tiempo más prolongado y faenados a diferentes días post inoculación lo que permitió concluir que la detección de PRRSv en las carnes, es dependiente del tiempo que transcurre entre que el animal es infectado y es faenado.

Por otro lado, es necesario considerar y señalar que el material genético de PRRSv encontrado en las muestras puede corresponder tanto a aislados de campo como vacunales, por lo tanto, para diferenciar el origen del virus presente en ellos es necesario realizar la amplificación del gen ORF5 y posterior secuenciación y comparación con aislados conocidos de las principales vacunas utilizadas. El kit comercial utilizado para el RT-PCR en tiempo real sólo permitió diferenciar entre las variantes norteamericanas y europea del PRRSv. Por esto y debido a que no se realizó el protocolo descrito anteriormente, dentro de las muestras positivas pueden existir falsos positivos que aumentan la magnitud de nuestro resultado. A pesar de lo anterior, es importante señalar que en estudios donde se han realizado estudios de transmisibilidad con ingestión de carne de cerdo contaminada, se han tenido resultados positivos al ingerir carne de cerdos infectados con cepas vacunales (Magar y Laroche, 2004; Raymond *et al*, 2017).

Determinación de viabilidad mediante aislamiento viral

El aislamiento viral realizado a las muestras positivas a RT-PCR, no dio resultados positivos y además los cultivos celulares fueron rápidamente contaminados con bacterias. Esto puede ser atribuido a las características de la muestra, ya que la carne utilizada ha sido sometida a manipulación, congelación y envasado. Si bien, esto no debiera involucrar un peligro para la inocuidad alimentaria, sí debe ser considerado como parte de las dificultades en la detección y aislamiento de PRRSv en esta matriz.

Cabe mencionar que si bien el aislamiento viral nos permite conocer si el virus presente en la muestra es viable, el aislamiento de PRRSv a partir de muestras de carne ha sido difícil de conseguir (Magar y Larochelle, 2004; Larochelle y Magar, 1997; Magar *et al*, 1995).

Es más, existe poca evidencia de estudios que han logrado con éxito aislar PRRSv a partir de muestras cárnicas que provienen de un proceso de producción normal, lo cual podría deberse a las temperaturas a las que son sometidas estas carnes. van der Linden *et al* (2003), realizaron aislamiento viral a partir de homogenizados de carne, antes de someter las muestras a congelación (-23°C) y posterior a su congelación por un período de 10 días, logrando aislar PRRSv a partir de 5 y 1 muestras respectivamente. Por lo tanto, la cantidad de virus viable disminuiría posterior al proceso de enfriado y congelación, condición que generalmente presentan las carnes de exportación y las del presente estudio.

También se utilizan otras técnicas, como los bioensayos para poder determinar si el virus presente es infeccioso. Específicamente en este caso, se ha evaluado y demostrado la capacidad de infección de PRRSv a través de la vía oral o ingestión de carne contaminada (van der Linden, 2003; Magar y Larochelle, 2004; Raymond *et al*, 2017), como también mediante el contacto de cerdos con el jugo de carne recolectado de la descongelación de carne de animales experimentalmente infectados (Cano *et al*, 2007).

Debido a que en Chile el virus se encuentra en proceso de erradicación, el riesgo que implicaría utilizar animales para potencialmente multiplicar el virus y reproducir la enfermedad experimentalmente mediante esta vía de transmisión, debe ser evaluado. Cabe mencionar, que no existe algún documento de fácil acceso de la autoridad sanitaria, que explícitamente prohíba o regule realizar este tipo de prácticas.

Por lo anterior, el aislamiento viral fue la técnica de elección, sin embargo, por la dificultad que ha implicado conseguir resultados positivos, sería más confiable la realización de bioensayos para efectivamente determinar si existe virus viable en las muestras de carne, y que además este se encuentre en la dosis infecciosa necesaria para producir la infección a través de la ingestión oral.

Origen de las muestras cárnicas

La mayoría de los estudios referentes al tema en discusión, utilizan carne o tejido muscular proveniente de animales experimentalmente infectados, y que no son sometidos a los procesos normales de la producción de la carne de cerdo, a diferencia del presente estudio que utiliza carne disponible en el mercado.

Específicamente, la carne utilizada proviene de la industria porcina estadounidense donde la edad promedio a la que los cerdos son faenados y comercializados es a los 6 meses de edad, con un peso promedio de 127 kg. Al ser un país endémico a la enfermedad, existe la posibilidad de que la carne provenga de animales pertenecientes a granjas positivas, donde generalmente los cerdos se infectan después del destete a una edad de 5-12 semanas e incluso a edades mayores, lo que permitiría que al momento de la faena existan cerdos virémicos (Alban *et al*, 2006), y por lo tanto exista PRRSv en el tejido muscular. Si bien las células musculares no son parte de las células blanco de PRRSv, se cree que este se alojaría en los macrófagos tisulares o en monocitos retenidos en vasos sanguíneos al momento de la faena (Hall y Neumann, 2015). Sin embargo, el procesamiento de la carne que será comentado en la siguiente sección, puede tener un impacto en su viabilidad.

En comparación a los animales experimentalmente infectados y que son faenados a los pocos días post infección, la viremia aún se encuentra en curso por lo que la probabilidad de que el tejido muscular o carne contenga PRRSv es mayor, lo cual podría explicar por qué en algunos de estos estudios ha sido posible lograr el aislamiento viral. Sumado a que el manejo del tejido muscular o carne, no es sometido a los procesos típicos de la carne comercial.

Carne como fuente de transmisión de PRRSv

La importancia del estudio de esta vía de transmisión, se debe a que la carne constituye un factor de riesgo reconocido para enfermedades como la Fiebre Porcina Clásica (FPC) y la Fiebre Porcina Africana (FPA). Es por esto, que la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO) ha recomendado en su manual de Buenas Prácticas de Bioseguridad en el Sector Porcino, evitar el uso de restos de comida que contengan carne de cerdo fresca como parte de la alimentación en las producciones

porcinas, o bien ser sometidos a un tratamiento previo a su utilización que corresponde a una cocción a 100°C por al menos 1 hora (FAO, 2010). Sin embargo, los virus causantes de las enfermedades mencionadas anteriormente, presentan diferentes características fisicoquímicas, que ante las condiciones que presenta la carne, principalmente pH y temperatura, favorecen su estabilidad por mayores períodos de tiempo. Es importante destacar que el pH de la canal porcina pasa de valores neutrales de 6,8-7,2 en el cerdo recién faenado, a 5.3-5.8 luego de la maduración de la carne (EFSA, 2005). Por esta razón, la viabilidad de PRRSv se ve disminuida en la etapa de maduración, ya que el rango de estabilidad de este virus es de 6.5-7.5 (Bloemraad *et al*, 1994).

Respecto a la temperatura, las carcasas son sometidas rápidamente a enfriamiento hasta alcanzar una temperatura < 7°C en el punto más profundo central del animal, con el fin de prevenir sobre crecimiento bacteriano, y que debe ser mantenida al momento del corte, deshuesado y desposte (Nastasijević *et al*, 2017). Al respecto, ha sido posible demostrar la sobrevivencia de PRRSv en carnes mantenidas a una temperatura de 4°C durante 6 y 3 días con altas y bajas concentraciones de virus, respectivamente; y a una temperatura de -20°C por 60 y 7 días, respectivamente (Patnayak, 2011), lo que permite concluir que el periodo de tiempo por el cual permanece viable dependería del título o concentración en la que se encuentra previamente a la disminución de la temperatura.

Si el virus llegase a sobrevivir y permanecer viable luego de las condiciones anteriormente mencionadas, la vía por la que se cree podría existir algún riesgo de generación de un brote de la enfermedad mediante importación de carne, sería a través de la alimentación de cerdos (de pequeñas producciones y de traspatio) con restos de comida o deshechos que contienen esta carne contaminada, y que posteriormente podría llegar a producciones industriales, a través de la vía aérea o por animales de reemplazo infectados (Niederwerder y Rowland, 2017).

Por último, si bien no hay un consenso oficial respecto al tema, existen ciertas conclusiones comunes como, por ejemplo: que existiría un bajo porcentaje de carnes (producidas en países endémicos) positivas a PRRSv y que este se encontraría en títulos bajos (Alban *et al*, 2006.; Magar y Laroche, 2004.). Además, su viabilidad se vería afectada por los procesos a los cuales es sometida la carne (van der Linden *et al*, 2003.; Patnayak, 2011) Pero a pesar

de todo esto, si se conjugan determinadas circunstancias el riesgo no es cero. En la Figura 3, se señalan los diferentes escenarios que se pudiesen presentar al entrar la carne contaminada con PRRSv a los deshechos, y que estos sean utilizados en alimentación de cerdos, junto a sus posibles resultados. (Figura 3) (Alban *et al*, 2006).

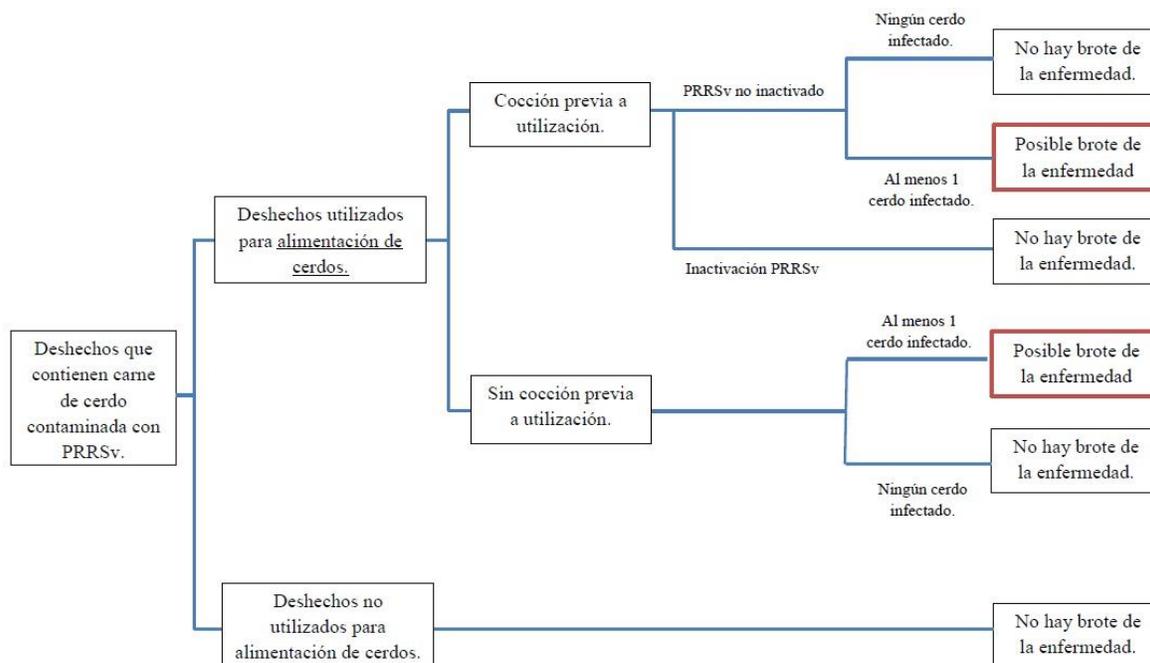


Figura 3- Diferentes vías por las cuales se puede producir un brote de PRRS por carne contaminada con PRRSv (Adaptado de Alban *et al*, 2006).

Por otro lado, algunos autores han argumentado mediante datos históricos de importación de carne desde países endémicos hacia países libres europeos y Nueva Zelanda, durante una década sin presencia de brotes, que la entrada de carne importada contaminada no constituye un factor de riesgo para esta enfermedad (Niederwerder y Rowland, 2017). Estos países sin embargo, han llevado estrictas medidas para el tratamiento de los deshechos de origen animal, lo cual puede contribuir a su permanencia como países libres (EFSA, 2005).

En cuanto al comercio internacional, la carne de cerdo se ha considerado como una “mercancía segura” por la OIE respecto a PRRS (OIE, 2017), pero de todas formas se deberían tomar medidas de prevención, principalmente a nivel de pequeñas producciones que son las que podrían realizar prácticas como la alimentación de sus animales con deshechos con carne de cerdo cruda.

CONCLUSIONES

A través del presente trabajo fue posible confirmar la presencia de material genético de PRRSv en carne de cerdo congelada importada a partir de un país endémico. Sin embargo, no fue posible determinar su viabilidad debido a las dificultades que surgieron al utilizar carne para la técnica utilizada para este propósito. Por esto, se desconoce si las muestras positivas efectivamente contenían virus viable, y el título en el cual se encontraban si lo anterior era confirmado.

Por lo anterior, sería necesario utilizar otra metodología como los bioensayos mencionados, para poder determinar la viabilidad de PRRSv en este tipo de muestras. La situación actual de nuestro país, el cual se encuentra en proceso de control y erradicación de esta importante enfermedad, dificulta la realización de este tipo de prácticas.

BIBLIOGRAFÍA

ALBAN, L.; DREW, T.; HAVE, P.; LE POTIER, M-F.; MURTAUGH, M.; NAUWYNCK, H.; WELLENBERG, G.; SÁNCHEZ VIZCAINO, JM.; WIERUP, M.; ZIMMERMAN, JJ. 2006 . Risk of pork transferring PRRS virus to pigs. Proceedings 11th Symp Intl Soc for Veterinary Epidemiology and Economics (ISVEE), 11:86.

ASPROCER. ASOCIACIÓN GREMIAL DE PRODUCTORES DE CERDO DE CHILE. s/a. Análisis sectorial. [en línea]. <<http://www.asprocer.cl/industria/analisis-sectorial/>> [consulta: 10-08-2016].

ATCC. s/a. Product Sheet. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (ATCC® VR2332™). [en línea]. < <https://www.atcc.org/~ps/VR-2332.ashx>>.

BLOEMRAAD, M.; KLUIJVER, E.; PETERSEN, A.; BURKHARDT, A.; WENSVOORT, G. 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(1994): 361-371.

CANO, J.; MURTAUGH, M.; DEE, S. 2007 Evaluation of the survival of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in non-processed pig meat. *Vet. Rec.* 160: 907-908.

CHO, J.; DEE, S. 2006. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Theriogenology.* 66(3): 655-662.

CHRISTIANSON, W.; JOO, H. 1994. Porcine reproductive and respiratory syndrome: A review. *The Association Journal of Swine Health and Production.* 2(2): 10-28.

CIACCI-ZANELLA, J.; SOBESTIANSKY, J. 2007. Síndrome reprodutiva e respiratoria dos suínos. **In:** Sobestiansky, J.; Barcellos, D. Editorial Canone, Goiania, Brasil. pp: 324-328.

COLLINS, J.; BENFIELD, D.; CHRISTIANSON, T.; HARRIS, L.; HENNINGS, J.; SHAW, D.; GOYAL, S.; MCCULLOUGH, R.; MORRISON, R.; JOO, H.; GORCYCA, D.; CHLADEK, D. 1992. Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus

(isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4: 117-126.

DOBRESCU, I.; LEVAST, B.; LAI, K.; DELGADO-ORTEGA, M.; WALKER, S.; BANMAN, S.; TOWNSEND, H.; SIMON, G.; ZHOU, Y.; GERDTS, V.; MEURENS, F. 2014. In vitro and ex vivo analyses of co-infections with swine influenza and porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *Vet. Microbiol.* 169(1-2):18-32.

EFSA. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. 2005. The probability of transmission of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus (PRRSv) to naive pigs via fresh meat. *EFSA Journal.* (2005) 239: 1-85.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS.; WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH.; WORLD BANK. 2010. Good practices for biosecurity in the pig sector-Issues and options in developing and transition countries. *FAO Animal Production and Health Paper No. 169.* Rome, FAO.

HALL, W.; NEUMANN, E. 2015. Fresh Pork and Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus: Factors related to the risk of disease transmission. *Transbound Emerg Dis.* 62(2015): 350-366.

HIERHOLZER, J. C.; KILLINGTON, R. A. 1996. Virus isolation and quantitation. In: Many, B.; Kangro, H. *Virology methods manual.* pp. 25-46.

INE. INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICAS. 2015. Encuesta de criaderos de cerdos. Informe preliminar segundo semestre año 2015. [en línea]. <www.odepa.cl/wp-content/uploads/2016/05/encuesta-criaderos-cerdos-2S2015.xls>. [consulta: 23-09-2016].

LAROCHELLE, R.; MAGAR, R. 1997. Evaluation of the presence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in packaged pig meat using virus isolation and polymerase chain reaction (PCR) method. *Vet. Microbiol.* 58(1997): 1-8.

LINHARES, D. 2013. Evaluation of immune management strategies to control and eliminate porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSv). Título Doctor en Filosofía Minnesota, United States. University of Minnesota. 148 p.

MAGAR, R.; LAROCHELLE R. 2004. Evaluation of the presence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pig meat and experimental transmission following oral exposure. *Can J Vet Res.* 68: 259–266.

MAX, V.; PÉREZ, P. 2015. Actualización del Plan Nacional de Control y Erradicación de PRRS Avances, lineamientos y próximos desafíos. **In:** Reunión de actualización, lineamientos y próximos desafíos. Plan de control y erradicación del Síndrome Respiratorio Porcino (PRRS).

MOLINA, R.; NELSON, E.; CRISTOPHER-HENNINGS, J.; HESSE, R.; ROWLAND, R.; ZIMMERMAN, J. 2009. Evaluation of the Risk of PRRSV Transmission via ingestion of muscle from persistently infected pigs. *Transbound Emerg Dis.* 56(2009): 1-8.

NASTASIJEVIC, I.; LAKICEVIC, B.; PETROVIC, Z. 2017. Cold chain management in meat storage, distribution and retail: A review. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci.* 85 (2017) 012022.

NEIRA, V.; BRITO, B.; MENA, J.; TORREMORELL, M.; CULHANE, M.; DEE, S.; JOHOW, M.; MATHIEU, C.; ORTEGA, R. 2015. Phylogenetic analysis of the recent outbreak PRRSv in Chile. **In:** Allen D. Lemans Swine Conference Recent Research Reports. Minnesota, Estados Unidos. 2015. College of Veterinary Medicine University of Minnesota. pp: 24.

NEIRA, V.; BRITO, B.; MENA, J.; CULHANE, M.; APEL, M.; MAX, V.; PEREZ, P.; MORENO, V.; MATHIEU, C.; JOHOW, M.; BADIA, C.; TORREMORELL, M.; MEDINA, R.; ORTEGA, R. 2017. Epidemiological investigations of the introduction of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Chile, 2013-2015. *PLoS One.* pp: 1-15.

NIEDERWERDER, M.; ROWLAND, R. 2017. Is there a risk for introducing Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) through the legal importation of pork?. *Food Environ Virol.* (2017) 9: 1-13.

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.

OIE. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. 2008. PRRS: the disease, its diagnosis, prevention and control. [en línea].
<http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/PRRS_guide_web_bulletin.pdf>. [consulta: 25-08-2016]

OIE. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. 2015a. Síndrome disgenésico y respiratorio porcino. **In:** Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres. [en línea]
<http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.08.06_PRRS.pdf>. [consulta: 25-08-2016]

OIE. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. 2015b. Enfermedades de los animales terrestres de la Lista de la OIE ausentes durante este periodo o nunca señaladas, Brasil, 2015. [en línea]. <http://www.oie.int/wahis_2/wah/health_v7_es.php>. [consulta: 25-08-2016]

OIE. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. 2017. Infección por el virus de síndrome reproductivo y respiratorio porcino. **In:** Código Sanitario para los animales terrestres. pp: 1-8.

OTAKE, S.; DEE, S.; ROSSOW, K.; MOON, R.; PIJOAN, C. 2002. Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by mosquitoes, *Aedes vexans* (Meigen). *The Canadian Journal of Veterinary Research.* 66: 191-195.

OTAKE, S.; DEE, S.; MOON, R.; ROSSOW, K.; TRINCADO, C.; PIJOAN, C. 2004. Studies on the carriage and transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by individual houseflies (*Musca domestica*). *Vet. Rec.* 154: 80-85.

OTAKE, S.; DEE, S.; CORZO, C.; OLIVEIRA, S.; DEEN, J. 2010. Long-distance airborne transport of infectious PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* from a swine population infected with multiple viral variants. *Vet. Microbiol.* 145(2010): 198-208.

PATNAYAK, D. 2011. Survival of porcine reproductive and respiratory virus and porcine circovirus on pork and pork products. [en línea] <<https://www.pork.org/wp-content/uploads/2011/05/08-135-PATNAYAK-UofMN.pdf>>. [consulta: 10-05-2018].

PRIETO, C.; SDREZL, P.; BAUTISTAZ, J.; SANCHEZ, R.; RILLD, M.; SIMARROI, I.; SOLANAT, A.; CASTRO, J. 1996. Semen changes in boars after experimental infection with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) virus. *Theriogenology.* 45: 383-395.

RAYMOND, P.; BELLEHUMEUR, C.; NAGARAJAN, M.; LONGTIN, D.; FERLAND, A.; MULLER, P.; BISSONNETTE, R.; SIMARD, C. 2017. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in pig meat. *Can. J. Vet. Res.* 81:162–170.

SAG. SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO. s/a. Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PPRS). [en línea]. <<http://www.sag.cl/ambitos-de-accion/sindrome-reproductivo-y-respiratorio-porcino-prrs>>. [consulta: 25-08-2016].

THACKER, E.; HALBUR, P.; ROSS, R.; THANAWONGNUWECH, R.; THACKER, B. 1999. *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus-Induced Pneumonia. *J. Clin. Microbiol.* 37(3): 620-627.

TOUSIGNANT, S.; PEREZ, A.; LOWE, J.; YESKE, P.; MORRISON, R. 2015. Temporal and spatial dynamics of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in the United States. *Am. J. Vet. Res.* 76(1): 70-76.

TORREMORELL, M. 2015. Comunicación Personal. U. de Minnesota.

VAN DER LINDEN, I.; VAN DER LINDE-BRIL, E.; VOERMANS, J.; VAN RIJN, P.; POL, J.; MARTIN, R.; STEVERINK, P. 2003. Oral transmission of porcine

reproductive and respiratory syndrome virus by muscle of experimentally infected pigs. Vet. Microbiol. 97(2003): 45-54.

WELLENBERG, G.; STOCKHOFE ZURWIEDEN, N.; BOERSMA, W.; DE JONG, M.; ELBERS, A. 2004. The presence of coinfections in pigs with clinical signs of PMWS in The Netherlands: a case control study. Res. Vet. Sci. 77(3): 177-184.

WENSVOORT, G.; TERPSTRA, C.; POL, J.; TER LAAK, E.; BLOEMRAAD, M.; DE KLUYVER, E.; KRAGTEN, C.; VAN BUITEN, L.; DEN BESTEN, A.; WAGENAAR, F.; BROEKHUIJSEN, J.; MOONEN, P.; ZETSTRA, T.; DE BOER, E.; TIBBEN, H.; DE JONG, M.; VAN'T VELD, P.; GREENLAND, G.; VAN GENNEP, J., VOETS, M.; VERHEIJDEN, J.; BRAAMSKAMP, J. 1991. Mystery swine disease in the Netherlands: The isolation of Lelystad virus. Vet. Q. 13(3): 121-130.

WILLS, R.; DOSTER, A.; GALEOTA, J.; SUR, J.; OSORIO, F. 2003. Duration of infection and proportion of pigs persistently infected with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. J. Clin. Microbiol. 37(3): 620-627.

ZIMMERMAN, J. 2003. Epidemiology and Ecology. **In:** Zimmerman, J.; Yoon, K. (Eds.). PRRS Compendium Producer Edition. Iowa State University. Iowa, United States. pp.27-34.

ZIMMERMAN, J.; BENFIELD, D.; DEE, S.; MURTAUGH, M.; STADEJEK, T.; STEVENSON, G.; TORREMORELL, M. 2012. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (Porcine Arterivirus). **In:** Zimmerman, J.; Kariiker, L.; Ramirez, A.; Schwartz, K.; Stevenson, G. (Eds). Diseases of swine. 10^a ed. pp. 461-486.

CERTIFICADO DE BIOSEGURIDAD

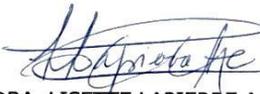


CERTIFICADO N° 96

Santiago, 16 mayo, 2017

El Comité de Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, ha revisado y aprobado el proyecto de memoria de título **"Identificación y Viabilidad del virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRSv) en carnes de cerdo importadas."**, de la Srta. Alejandra Aravena, cuyo profesor guía es el Dr. Víctor Neira, académico de FAVET.

El proyecto se llevará a cabo en los Laboratorios del Servicio Agrícola Ganadero (SAG) por lo que las normas de bioseguridad que se encuentran descritas en el proyecto y en el formulario de solicitud de certificados de bioseguridad de FAVET, son las adecuadas según las especificaciones contenidas en el "Manual de Bioseguridad en el Laboratorio, de la Organización Mundial de la Salud (versión 2005)" y el "Manual de Bioseguridad de Conicyt" (versión 2008), que previenen los riesgos para las personas, los animales y el medioambiente.


DRA. LISETTE LAPIÈRE A.

Coordinadora
Comité de Bioseguridad
FAVET



PLANIFICACIÓN

Actividad	Mes 1	Mes 2	Mes 3	Mes 4	Mes 5	Mes 6
Presentación anteproyecto	X					
Obtención de muestras	X					
Procesamiento de muestras	X					
RT-PCR		X				
Aislamiento y titulación viral			X			
Análisis de resultados			X	X	X	
Presentación avance				X		
Finalización del escrito					X	
Presentación final						X