

Detección de Sapovirus porcino mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en el municipio de León durante el periodo de Febrero-Agosto del 2009.

---

# Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua

UNAN-León

Carrera de Medicina Veterinaria



Tesis para optar al título de  
Licenciado en Medicina Veterinaria

Título:

Detección de Sapovirus porcino mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en el municipio de León durante el periodo de Febrero-Agosto del 2009.

Autores:

Br. Armando José Cortez Berrios

Br. Pedro Juan Cano López.

Tutores:

MSc. José Luis Bonilla. DMV.

Dr. Filemón Bucardo, MSc, PhD.

Asesor:

MSc. Christiane Duttman

## I. AGRADECIMIENTO

Gracias a Dios Padre TODOPODEROSO, por habernos concedido sabiduría, paciencia y fortaleza necesaria todo este tiempo para poder culminar mis estudios.

A nuestros Padres y hermanos, por brindarnos su apoyo incondicional en todo el transcurso de nuestros estudios, demostrándonos siempre que somos una unidad familiar.

A nuestros Tutores: MSc. José L. Bonilla, Dr. Filemón Bucardo, MSc, PhD, por haber confiado en nosotros y llevar a cabo esta investigación que ha sido muy enriquecedora en nuestra carrera.

A la Doctora MSc.ChristianeDuttmann, por concedernos parte de su tiempo para ayudarnos en las correcciones del trabajo.

A los compañeros Duillo Sandino, Wilber Moreno y a Héctor Pararon por habernos ayudado en la recolección de las muestras.

## II. RESUMEN

Se realizó un estudio descriptivo sobre la detección de Sapovirus en cerdos de todas las edades en crianza de traspatio en el Municipio de León. El análisis se realizó a partir de muestras fecales, utilizando la técnica de Rt-PCR. Se recolectaron un total de 100 muestras fecales de las que se analizaron solamente 86 por razones de costo, estas fueron colectadas en 90 viviendas ubicadas en 3 comarcas: *Chacaraseca* en los sectores (Mojón sur, Raúl cabeza, los Salgados, el Refugio, los Pérez, los Toval) y dos fincas: Santa Teresa y San Ramón; *el Convento* y *La Ceiba*, y 4 repartos: *Rubén Darío*, *Salomón de la Selva*, *Azarías H Palleis* y *Antenor Sandino*.

De acuerdo a los resultados obtenidos se encontró una presencia del 9% de Sapovirus. Estos revelan que si hay presencia de Sapovirus en la zona geográfica estudiada. Este es el primer estudio realizado en el país sobre Sapovirus porcino.

Palabras claves: Calicivirus, Sapovirus, Detección, Porcino.

### III. INDICE

	Pag.
<b>AGRADECIMIENTO.....</b>	<b>I</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>II</b>
<b>INDICE.....</b>	<b>III</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Antecedentes.....</b>	<b>2</b>
<b>3. Planteamiento del Problema.....</b>	<b>4</b>
<b>4. Justificación.....</b>	<b>5</b>
<b>5. Objetivos.....</b>	<b>6</b>
<b>6. Marco Teórico.....</b>	<b>7</b>
<b>6.1 Etiología.....</b>	<b>7</b>
<b>6.2 Epidemiología.....</b>	<b>9</b>
<b>6.3 Patogenia.....</b>	<b>10</b>
<b>6.4 Manifestaciones Clínicas.....</b>	<b>10</b>
<b>6.5 Diagnostico.....</b>	<b>11</b>
<b>6.6 Tratamiento.....</b>	<b>11</b>
<b>6.7 Prevención, Control y Profilaxis.....</b>	<b>12</b>
<b>7. Metodología.....</b>	<b>13</b>
<b>8. Resultados.....</b>	<b>16</b>
<b>9. Discusión.....</b>	<b>19</b>
<b>10. Conclusión.....</b>	<b>21</b>
<b>11. Recomendaciones.....</b>	<b>22</b>
<b>12. Bibliografía.....</b>	<b>23</b>
<b>13. ANEXOS.....</b>	<b>25</b>

## 1. INTRODUCCION

La diarrea en animales es una de las tantas enfermedades que afectan en la crianza porcina, la cual puede ser causada por agentes de origen múltiple o factores predisponentes que contribuyen a agravar los brotes.

Los Calicivirus son en general causas de enfermedades vesiculares, hemorrágicas y respiratorias en animales, además son los principales responsables de enfermedades entéricas en humanos. (Alcalá A et al.2003)

El género Sapovirus perteneciente a la familia Caliciviridae, está asociado a gastroenteritis en humanos y animales. Los Sapovirus son agentes que producen afecciones de tipo entéricas en los animales, los cuales pueden presentarse desde las primeras semanas de vida hasta que son adultos, por lo que es considerado uno de los agentes que afecta severamente en la producción, y por ende la economía del país.

El análisis molecular de la polimerasa y los genes de la cápside de Sapovirus (SaVs) y Norovirus (NoVs) porcino, ha demostrado una amplia gama de diversidad genética, sin embargo, la información sobre su epidemiología y el papel de patógenos de estos dos géneros es limitado (Berrios-Etcheagaray, 2009). Por lo que con el presente estudio se pretende determinar la presencia de Sapovirus en porcinos de todas las edades, en sectores de las comarcas de Chacaraseca, La Ceiba, El Convento y los Repartos. Rubén Darío, Salomón de la Selva, Asarias H Palleis y Antenor Sandino, del municipio de León. Además se considera como una pauta para posteriores investigaciones debido a que es un estudio nuevo y para que las autoridades correspondientes sepan de la existencia del virus en la zona, ya que la diarrea es una de las principales causas de pérdidas económicas.

## 2. ANTECEDENTES

En 1980, fue identificado Sapovirus porcino de la cepa Cowden, junto con Rotavirus y Astrovirus, en muestras de heces diarreicas de los lechones por Microscopia Electrónica (ME) en USA. SAV porcinos han sido identificadas posteriormente en Corea del Sur, Venezuela, Hungría, Italia y Bélgica, lo que sugiere que tienen una distribución mundial de las poblaciones de la especie porcina. (Berrios-Etchegaray, 2009)

En otro estudio llevado a cabo en Quebec, Canadá en el año 2005 al 2007, donde se recolectaron 266 muestras de heces de cerdo, fueron seleccionadas para determinar la presencia de Calicivirus por Reverso transcripción-reacción en cadena de la polimerasa (Rt-PCR). La presencia de Calicivirus se detectó en la mayoría de las explotaciones, encontrándose en un 75%. (Homme et. al. 2005-2007)

Se realizó un estudio para evaluar la diversidad genética de Sapovirus porcino en cerdos con diarrea en Corea del Sur. Doscientos treinta y siete muestras de heces de cerdos con diarrea fueron examinadas a partir de 78 fincas de más de un período de 2 años a partir de seis provincias en Corea del Sur. En total, 69 (29,1%) de las muestras procedentes de cinco provincias dio positivo por Sapovirus porcino ya sea por RT-PCR o PCR anidada con los pares de primers específicos para la especie porcina SAVS. ([JeongC.](#) et, al 2007)

En el 2009 investigadores coreanos llevaron a cabo un estudio sobre la presencia de Norovirus porcinos (NoVs) y Sapovirus (SaVs) en muestras fecales, con un total de 537 cerdos procedentes de 64 explotaciones porcinas coreanas. Un 1,9% de las muestras fueron positivas para presencia de

NoVsmientras que un 11,2% lo fueron para SaVs, lo que muestra su circulación en Corea. Los NoVs fueron relacionados genéticamente con las cepas 11 y 18, del genogrupo II de los Norovirus; mientras que las cepas SaV se relacionaron genéticamente con la cepa Cowden de los Calicivirus porcinos y con cepas porcinas coreanas identificadas con anterioridad pertenecientes al genogrupo III de los Sapovirus. En ningún caso se observó co-infección con NoV y SaV en ningún cerdo. (Keumm Ho et. al. 2009)

Se llevó a cabo un estudio en la comunidad del Salvador de Bahía en Brasil; con el objetivo de investigar la presencia de Calicivirus de los géneros Sapovirus y Norovirus, se recolectaron 139 muestras fecales, de julio 2001 a enero 2002 y fueron analizadas mediante RT-PCR, resultando 13(9%) positivas para Calicivirus. Al secuenciar, siete aislamientos fueron caracterizados como Norovirusgenogrupo GII y uno como Sapovirus genotipo GII. (Xavier et al, 2009)

Se realizó un estudio en Brasil durante el periodo 2004 donde se recolectaron 18 muestras fecales de lechones de hasta 28 días de nacido, estas fueron examinadas para determinar la presencia de Sapovirus por RT-PCR, con iniciadores (primers) diseñados para amplificar un segmento de 331 pb del gen de la polimerasa de ARN. En un 44,4% (18/08) de las muestras fecales se obtuvo un fragmento de ADN amplificados. Uno de estos fragmentos se secuenció y sometidos a análisis molecular y filogenética. Este análisis reveló una alta similitud, con nucleótidos (87%) y aminoácidos (97,8%), a la cepa Cowden, el prototipo de GIII porcina Calicivirus. Esta es la primera descripción de Sapovirus en rebaños porcinos brasileños. (Aline F. Barry et al, 2008)

En la actualidad no existen reportes de Sapovirus en cerdos en la región Centroamericana.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los problemas gastrointestinales son unas de las principales causas de pérdidas económicas en la crianza porcina. En Nicaragua la gastroenteritis es asociada a un sin número de factores entre ellos ambientales, nutricionales, parasitarios e infecciosos; siendo esta ultima la de mayor riesgo para la explotación porcina. Entre los diferentes agentes infecciosos asociados a procesos diarreicos, los virus ejercen un papel muy importante en las primeras semanas de vida, sin embargo existe una gran diversidad de agentes virales involucrados, como Rotavirus, Togavirus, Coronavirus, entre otros. También existe otro género que ataca fuertemente el tracto gastrointestinal de los cerdos, además de los problemas respiratorios que este puede causar, como es el Sapovirus; pero se desconoce la circulación de este agente en las explotaciones porcinas de nuestra localidad; por lo que con este estudio, se pretende **Identificar la presencia de Sapovirus porcino en zonas rurales del munición de León en el periodo comprendido de Febrero–Agosto del 2009.**

#### **4. JUSTIFICACION**

La infección producida por Sapovirus son de tipo entéricas (gastroenteritis) y se considera un problema de salud pública a nivel mundial. En la actualidad no existe un estudio realizado de Sapovirus en Nicaragua sobre animales, sin embargo en humanos si se han comenzado a realizar, aunque no se han hecho reportes sobre ello.

Por tal razón este estudio se llevará a cabo en las comarcas de Chacaraseca, La Ceiba, El Convento y los Reptó. Rubén Darío, Salomón de la Selva, Asarias H Palleis y Antenor Sandino del Municipio de León, con el objetivo de Identificar la presencia de Sapovirus en cerdos de todas las edades, y así proporcionar información acerca de la existencia de este agente y por ende se considera de mucha importancia ya que aportaría información epidemiológica para futuras investigaciones.

## **5. OBJETIVO GENERAL:**

- Determinar la presencia de Sapovirus porcinos en las comarca de: Chacaraseca, La Ceiba, El Convento y los Repartos: Rubén Darío, Salomón de la Selva, Asarias H Palleis y Antenor Sandino del Municipio de León durante el periodo de Febrero- Agosto del 2009.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS:**

- Identificar la presencia de Sapovirus porcino mediante la técnica de reverso transcripción-reacción en cadena de la polimerasa, (Rt)-PCR.
- Describir la presencia del virus con respecto a edad, sexo, raza y localidad.

## 6. MARCO TEORICO

Hay muchas causas potenciales de diarrea en animales, no siendo todas infecciosas. Los procesos entéricos pueden afectar animales de todas las edades.

*Entre los agentes infecciosos que producen gastroenteritis tenemos los de la familia Caliciviridae dentro de ellos el género Sapovirus, tiene mucha importancia debido a su posible afectación zoonótica.*

### **Familia Caliciviridae**

La familia Caliciviridae se divide en por lo menos cuatro géneros, *Norovirus*, ***Sapovirus***, *Vesivirus* y *Lagovirus*. Los Norovirus y Sapovirus pueden infectar a animales incluyendo vaca y cerdo, respectivamente. (Grant S. et al 2010).

Los Calicivirus son una causa conocida de enfermedades vesiculares, hemorrágicas y respiratorias en animales; además son una causa importante de enfermedades entéricas en humanos (Alcalá A et al.2003), sin embargo, la información sobre su epidemiología y el papel de patógenos en los cerdos es limitado. (Berrios-Etcheagaray 2009)

### **6.1 Etiología**

Los Calicivirus son pequeños, sin envoltura, miden 27 - 38 nm de diámetro, el ARN contienen una sola cadena de 7,3-8,4 Kb de sentido positivo. El genoma codifica 6 proteínas no estructurales, entre las que se encuentran una helicasa/ATPasa, una proteasa y una polimerasa de ARN dependiente de ARN celular y 2 proteínas estructurales. (Alcalá A et al.2003). Los Calicivirus están asociados con una amplia gama de enfermedades importantes de animales y seres humanos. (Berrios-Etcheagaray 2009)

Algunos Calicivirus porcinos están estrechamente relacionados genéticamente con varios Sapovirus (SAV) humanos y las cepas Norovirus (NoV), lo que ha llevado a una posible transmisión cruzada de especies con problemas de salud pública que sugieren que la evolución de la SAVS animal y humana están estrechamente entremezclados. (Berrios-Etchegaray 2009)

### **SAPOVIRUS**

El género Sapovirus pertenece a la familia *Caliciviridae*, infectan a niños y adultos y se sospecha que juegan un papel en la patogénesis de la enteritis en lechones, este virus puede producir brotes epidémicos de gastroenteritis. El prototipo de este género es el virus Sapporo y se han descrito 5 genogrupos. Hasta el momento no existen métodos inmunológicos comercializados para el diagnóstico de las infecciones por Sapovirus, por lo que el diagnóstico debe realizarse por técnicas de RT-PCR con cebadores específicos de Sapovirus o con cebadores comunes a Norovirus y Sapovirus. (Martínez Miriam et al. 2007)

### **Etiología**

Este virus presenta morfología con aspecto de estrella de David (Rius Cristina et al, 2007). El genoma viral consiste en dos marcos de lectura abiertos que codifican las proteínas no estructurales y la proteína de la cápside o la proteína de virus 1 (VP1) codificados en un marco abierto de lectura (ORF-1) y una proteína llamada VP2 que se codifica en ORF-2 que se encuentra en el extremo 3' del genoma y codifica una proteína básica de función desconocida. ORF-1 está prevista para codificar una única poliproteína que es procesada por la proteasa viral, dando lugar a la aparición de proteínas no estructurales necesarias para la replicación del genoma viral. (Stephen et al 2007)

Sobre la base completa de las secuencias de genes de la cápside, Sapovirus se puede dividir en 5 genogrupos, entre los cuales GI, GII, GIV, y GV infectan a los humanos, mientras que Sapovirus GIII infecta a la especie porcina (**Grant S et al 2007**).

SAV GI, GIV y GV poseen tres ORFs, mientras que SAV GII y GIII sólo tienen dos ORFs principal. SAVS humanos son genéticamente variables, y por lo menos 13 grupos genéticos o genotipos (GI.1 a G1.5, GII.1 a GII.6, GIV.1, y GV.1), han sido identificados. (Martella et, al, 2008)

El SAVS porcino comprenderá 2 genogrupos actualmente descubiertos (JJ681 como GVI y LL26/K7- como GVII) y posiblemente un genogrupo potencialmente nuevo (QW19 similares), similar a SAVS humano. (Qiu-Hong Wang, et al. 2007)

## **6.2 EPIDEMIOLOGIA**

### **Reservorio**

El único reservorio confirmado es el tracto gastrointestinal del ser humano, aunque tanto el hombre como los animales infectados pueden excretar el virus en grandes cantidades a través de las heces. (Rius Cristina et al 2007)

### **Mecanismo de transmisión**

El mecanismo de transmisión es fecal-oral. Es poco probable que este grupo de virus sea transmitido por vía aérea. Sin embargo, se ha implicado el vómito como vía de transmisión de estos virus este solo en especies que pueden vomitar. (Rius Cristina et al 2007)

En este caso, la transmisión se produciría a través de los aerosoles generados durante la emisión del vómito. Este grupo de virus ha sido

frecuentemente identificado como causa de brotes transmitidos a través del agua y los alimentos contaminados a partir de una fuente de infección.

Se han descrito muchos alimentos implicados en la transmisión, pero particularmente están implicados aquéllos que tienen contacto con agua contaminada. (Rius Cristina et al 2007)

Los brotes de gastroenteritis producidos por Sapovirus son frecuentes en ámbitos cerrados como alojamientos inadecuados y en el caso de los humanos como hospitales, cuarteles etc. (Rius Cristina et al 2007)

El período de incubación es de 24 a 48 horas y la transmisión incluye toda la fase aguda de la enfermedad hasta 48 horas después de la finalización de los síntomas. La capacidad infectiva de este virus es muy elevada, estando en relación con una baja dosis infectiva (100 viriones), unas elevadas cifras de virus excretados y una alta persistencia en agua, alimentos o superficies inanimadas contaminadas. (Rius Cristina et al 2007)

### **6.3 Patogenia**

El mecanismo por el cual se produce la diarrea por Sapovirus es desconocido; sin embargo, se ha sugerido que el retraso en el vaciamiento gástrico observado en estas gastroenteritis podría jugar un papel importante. (Martínez María et al 2007)

### **6.4 Manifestaciones clínicas**

Después de un período de incubación de 12-48 horas aparecen náuseas, vómitos y diarrea. El comienzo de los síntomas puede ser gradual o abrupto produciendo una gastroenteritis aguda. Los primeros signos son dolores cólicos abdominales, con náuseas o sin ellas. También se observan mialgias,

astenia y cefaleas ocasionales. En cerca de la mitad de los casos aparece fiebre. Las manifestaciones persisten habitualmente entre 48 y 72 horas y remiten sin secuelas. (Martínez María et al 2007)

En general, las heces diarreicas son de una cantidad moderada, con 4 a 8 deposiciones durante 24 horas. No contienen sangre ni moco, y pueden ser acuosas; tampoco se observan leucocitos fecales. La enfermedad normalmente es leve y auto limitada, pero tiene una tasa de ataque secundario elevada, resultando en altas tasas de transmisión. (Martínez María et al 2007)

La máxima eliminación de virus en las heces se produce en los primeros días tras la infección, pero puede continuar incluso después de tres semanas. (Martínez María et al 2007)

### **6.5 Diagnóstico.**

El diagnóstico de laboratorio de SaVs se enfoca en la detección de antígeno viral, ácido ribonucleico (ARN viral) y anticuerpo sérico. En Microscopía Electrónica (ME) y ensayo inmunoenzimáticos ligado a una enzima (ELISA directo) detecta viriones intactos y antígenos virales respectivamente; la Reverso transcripción inversa (Rt-PCR) y PCR en tiempo real detecta ARN viral; y antígenos recombinantes de partículas sintéticas similares al virus han sido ampliamente usado como antígenos para que el anticuerpo ELISA detecte en plasma sanguíneo los anticuerpos. Excepto para PCR de tiempo real, todos los métodos citados anteriormente han servido para la detección de NoVs y SaVs porcino. (Qiu-Hong Wang, et, al 2007)

No existen métodos inmunológicos que se comercialice para diagnosticar las infecciones por Sapovirus, por lo que debe realizarse por técnicas de PCR con cebadores específicos de Sapovirus. (Álvarez Miriam et, al 2008)

## **6.6 Tratamiento**

No hay un tratamiento específico para las infecciones por Sapovirus. En la mayoría de los casos es adecuado la rehidratación oral y electrolitos.

En raros casos puede necesitarse rehidratación parenteral; también se puede realizar una antibioterapia profiláctica para evitar las infecciones secundarias (Martínez María et al 2007)

## **6.7 Medidas de prevención y control**

A pesar de que el contacto directo sea la forma más frecuente de extensión de los brotes, la contaminación de un vehículo común, como el agua o los alimentos, es a menudo el punto de inicio. Por ello, la prevención de las infecciones por virus causantes de gastroenteritis aguda, debe centrarse en evitar la contaminación inicial del vehículo implicado y en minimizar la transmisión directa. (Rius Cristina et al año 2007)

Para el control de los brotes de gastroenteritis por Sapovirus se recomienda la identificación temprana de la fuente de infección, el lavado de manos, la desinfección de materiales contaminados y el uso de guantes con el fin de prevenir la transmisión cruzada. (Rius Cristina et al año 2007)

Por todo ello, es recomendable tanto la vigilancia de las condiciones higiénicas del agua de consumo y de los alimentos y su manipulación. (Rius Cristina et al año 2007)

En relación a la prevención de la transmisión animal a persona, ésta consiste básicamente en el lavado de manos con agua y jabón y la limpieza de ropas contaminadas luego de haber estado en contacto con el animal. Además, aquellos animales con infección por Sapovirus deben ser manejados teniendo en cuenta las precauciones universales e incluso con medidas para evitar la transmisión por contacto en aquellos casos que forman parte de un brote, que presentan incontinencia de esfínteres o cuando se pueda producir la contaminación de la ropa del personal. Debido a la falta de inmunidad a largo plazo, parece difícil el desarrollo de una vacuna para la prevención de la gastroenteritis por Sapovirus (Rius Cristina et al año 2007)

## **7. METODOLOGIA**

### **Tipo de estudio:**

El tipo de estudio de este trabajo es descriptivo de corte transversal, con lo cual se trató de identificar la presencia de Sapovirus porcino en cerdos de todas las edades con o sin sintomatología de diarrea, en las comarcas de Chacaraseca, La Ceiba, El Convento y los Repto. Rubén Darío, Salomón de la Selva, Azarías H. Palleis y Antenor Sandino del municipio de León en el periodo de Febrero – Agosto del 2009.

### **Población y tamaño de muestra:**

La población de estudio fueron todos aquellos porcinos de cualquier edad de crianzas de cerdos de traspatio, que presenten síntomas o no de diarrea de etiología desconocida. Pero que estuvieran dentro de la región de estudio.

Para el tamaño de la muestra se utilizó el programa WinEpiscope 2.0, para la detección del virus, tomando una población de 278 animales la cual sale del mismo censo al momento del estudio, con una prevalencia de 1% y un nivel de confianza del 95%, siendo un tamaño de muestra necesario de 175 animales.

La selección de la muestra se realizó tomando criterios de inclusión que eran la edad (de cualquier edad), el sexo (ambos), raza (cualquiera), y criterios de exclusión que son solamente que el productor no quisiera tomarle muestra a dicho animal.

### **Lugar de estudio**

Las muestras fueron recolectadas al azar en crianza de cerdos de traspatio, las cuales se encuentran en 3 comarcas: *Chacaraseca* en los sectores (mojón sur, Raúl cabeza, los Salgados, el Refugio, los Pérez, los Toval) y dos fincas: Santa Teresa y San Ramón; *el Convento* y *La Ceiba*, y 4 repartos: *Rubén Darío*, *Salomón de la Selva*, *Azarías H Palleis* y *Antenor Sandino*, del Municipio de León; se escogieron estos lugares por que anteriormente se hicieron estudios sobre este virus que probablemente estaban asociados a infecciones en humanos(niños menores de 5 años).

### **Recolección y envío de Muestra:**

Las muestras fecales fueron recolectadas directamente del recto del animal a través de la estimulación rectal previa para provocar la evacuación.

Estas fueron depositadas en frascos recolectores debidamente etiquetados (código de la muestra y fecha de recolección). A cada muestra se llenó una ficha con la siguiente información: nombre del propietario, dirección de la vivienda, nombre del animal, edad, raza, sexo, color de piel y sintomatología clínica. (Ficha en el anexo)

Posteriormente las muestras fueron llevadas en termos con refrigerantes al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNAN-LEÓN para su análisis.

### **Técnica utilizada en el estudio**

**RT-PCR** (detección de ARN viral por reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa).

#### *-Extracción del ARN*

El ARN viral fue extraído de 86 muestras de heces mediante el método Trizol (Gibco, BRL, Gaithers-burg, MD).

#### *-Reverso Transcripción*

La reverso-transcripción se realizó en 50 ul de la mezcla de reacción que contiene 5uL de tampón 10X PCR (100 mM Tris-HCl pH 8.3; 20 Mm MgCl<sub>2</sub>; 500mM KCL; 0,01% de gelatina), 5 ul de BSA (1%), 4 ul de dNTP mix (5 mM), 2 ul de cebador (primers sentido negativo 0.1 ug / ul), 0.25 ulARNasa (40U/ul, Promega), 0.35 ul AMV-RT (20 U / ul, Promega), 31 ul de agua tratada con DEPC y 3 ul del ARN extraído a 42°C durante 1 hora.(X. Jiang et al 1999)

Los cebadores utilizados para la RT-PCR incluyó p289/290, Sap36/35 que fueron diseñadas en base a las secuencias de ARN polimerasa de SLVs (Tabla 1) (Jiang et al., 1992; Moe et al., 1994; Wang et al., 1994; Matson et al., 1995; Berke et al., 1997).

### **PCR, Amplificación**

Para PCR, se agregó 50 ul de tampón para PCR a 1X conteniendo el cebador positivo y la Taq polimerasa. El programa del termociclador incluye 94°C por 3 minuto, 40 ciclos a 94°C por 30 segundo, 49°C por 1 minuto 20 segundo, y 72°C por 1 minuto, y una extensión final de 10 minutos, seguidamente se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 1% para su posterior visualización en luz ultravioleta.

El tamaño de los productos de RT-PCR fueron 331 bp para SaVs, que se diferencian por electroforesis en gel de agarosa (datos mostrados)

**Tabla1.** Lista de ARN polimerasa, primer usados en la detección de SapVs, por reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa.

Primer	Secuencia	Localización	Polaridad
Sap 36	5`-GTTGCTGTTGGCCATTAACA	4487-4505	Positiva
Sap 35	5`-GCAGTGGGTTTGAGACCAAAG	4936-4956	Negativa

## 8. RESULTADOS

En el presente estudio se lograron coleccionar 100 muestras fecales de cerdos de distintas edades, de las cuales solo se analizaron 86 por motivos de costo, obtenidas en Fincas y crianza domestica localizadas en zonas rurales del Municipio de León.

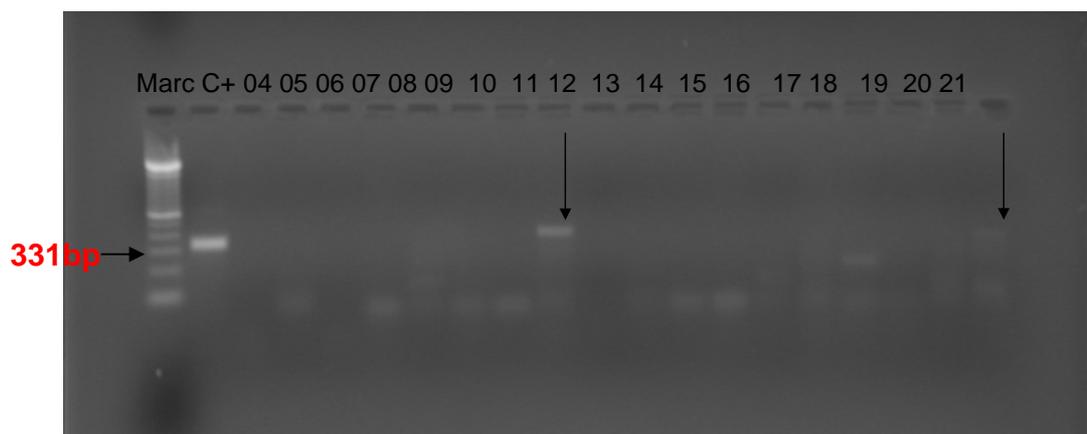
Tabla 1. Presencia de Sapovirus en 86 muestras analizadas.

	Número de Animales	Porcentaje de Animales
Positivo	8	9.3%
Negativo	78	90.7%

### Resultados del Rt-PCR

Figura 1. Resultados del RT-PCR. Gel de agarosa al 2% mostrando el amplicon 331bp de Sapovirus en el Municipio de León. (M: Marcador 100 bp (Roche Biochemicals); C+: control positivo; 11 y 21: positivos)

Fig. 1



Dentro del estudio se tomaron en cuenta variables que probablemente estuvieran asociadas a la presencia de Sapovirus, como fueron: edad, raza, sexo, localidad. Estas se muestran en las siguientes gráficas.

Tabla 2. Numero de positivos según la edad en las muestras analizadas

<b>Nº de cerdos</b>	<b>Edad</b>	<b>Positivos</b>
7	1 mes	2
13	2 meses	1
24	3 meses	2
10	4 meses	2
5	5 meses	0
8	6 meses	0
4	7 meses	0
5	8 meses	0
0	9 meses	0
3	10 meses	0
0	11 meses	0
3	12 meses	1
4	12 meses a mas	0
<b>86</b>		<b>8</b>

Los datos mostrados en esta tabla indica más que todo la presencia del virus la cual se refleja en las edades de 1 a 4 meses de edad, donde la mayor muestra se tomó en cerdos de estas edades.

Tabla 3. Número de animales positivos a Sapovirus según la raza en las muestras analizadas.

<b>Nº de credos</b>	<b>Raza</b>	<b>Positivos</b>
<b>81</b>	<b>Criolla</b>	<b>7</b>
<b>5</b>	<b>Landrace</b>	<b>1</b>
<b>86</b>		<b>8</b>

Nota: La mayoría de los cerdos muestreados eran de la raza criolla, por lo que es significativo que salieran más positivos de esta raza.

Tabla 4. Número de animales positivos a Sapovirus según el Sexo en muestras analizadas.

<b>Nº de credos</b>	<b>Sexo</b>	<b>positivos</b>
<b>39</b>	<b>Hembra</b>	<b>3</b>
<b>47</b>	<b>Macho</b>	<b>5</b>
<b>86</b>		<b>8</b>

Nota: Al igual que la tabla anterior la mayoría de los cerdos eran machos por lo que salen más positivos con respecto a este sexo.

Tabla 5. Presencia de Sapovirus según la localidad de estudio

<b>Nº de credos</b>	<b>Localidad</b>	<b>Positivos</b>
<b>17</b>	<b>Reptó. Rubén Dario</b>	<b>1</b>
<b>17</b>	<b>Reptó. Salomón de la Selva</b>	<b>1</b>
<b>7</b>	<b>Reptó. Asarias H Palleis</b>	<b>0</b>
<b>3</b>	<b>Repto. Antenor Sandino</b>	<b>0</b>
<b>24</b>	<b>Comarca Chacaraseca</b>	<b>3</b>
<b>18</b>	<b>Comarca La Ceiba</b>	<b>3</b>
<b>86</b>		<b>8</b>

## 9. DISCUSIÓN

Este es el primer reporte en Nicaragua referido a la presencia de Sapovirus en cerdos de cualquier edad, el estudio se llevó a cabo en 90 sitios los cuales se encuentran en 3 comarcas: Chacaraseca (en los sectores de: Mojón Sur, Raúl Cabeza, los Salgados, el Refugio, los Pérez, los Toval y dos fincas: Santa Teresa y San Ramón); el Convento y La Ceiba, y 4 repartos: Rubén Darío, Salomón de la Selva, Asarias H Palleis y Antenor Sandino, del Municipio de León durante un periodo de 7 meses (febrero – Agosto 2009).

En base a los resultados obtenidos en la Gráfica. 1, se determinó un 9.3% de presencia, equivalente a 8 muestras positivas a Sapovirus porcino, De las 86 muestras analizadas por Rt-PCR, las cuales se muestran en la Fig.1 donde 2 de las muestras 11 y 21 salen positivas por tener un peso de 331 bp con respecto al control positivo. Esto no difiere de otros estudios realizados en otros países, como es el caso de Corea donde se reportó solamente 60(11,2%) de presencia de SAVs porcino en 537 muestras fecales procedentes de 64 provincias coreanas, analizadas por Rt-PCR. (Keumm Ho et. al. 2009)

La variabilidad de presencia por Sapovirus en cerdos, puede estar asociado a numerosos factores, hay que tomar en cuenta la cantidad de los animales estudiados el cual fue de una muestra pequeña. También es importante mencionar el sitio de donde se colectaron las muestras de estudio debido a los factores de riesgo de contaminación cruzada con otras especies de animales de crianza domésticas.

Según los resultados en la Gráfica.2, se encontró que las edades en que más hubo presencia de Sapovirus fueron entre 1-4 meses de edad. Este estudio coincide con otro estudio realizado en Brasil, donde ha sido demostrado que el virus afecta a lechones en las primeras semanas de vida en las cuales alcanza una mayor frecuencia de positividad. (Aline F. Barry et al, 2008).

Con respecto a la raza en la Gráfica. 3, observamos que hubo mayor presencia de Sapovirus frente a la raza **Criolla**, debido a que predomina esta raza con respecto a otras en las zonas de estudiada.

En la Grafica 4, con respecto al sexo se detectó mayor presencia de Sapovirus en machos que en hembras, esto debido a que en los sectores muestreados se encontraron mayor cantidad de macho que hembras.

En la Grafica 5. Se muestran las zonas de estudio donde se detectó mayor presencia de Sapovirus en la zona rural (Chacaraseca y La Ceiba) en relación a los otros sectores de estudio, esto sugiere que puede ser que haya mayores factores de contaminación en la zona rural que en la zona semirural.

## 10. CONCLUSIONES

Luego de haber realizado todos los estudios pertinentes y las técnicas laboratoriales adecuadas llegamos a las siguientes conclusiones:

- ❖ Concluimos que hay presencia de Sapovirus porcino circulante en Nicaragua ya que nuestros resultados así lo demuestran. Por medio de la técnica Rt-PCR hay una positividad del 9.3% a **Sapovirus** específicamente en el Municipio de León.
- ❖ Los animales positivos a Sapovirus que se encontraron estaban entre las edades de 1- 4 meses ya que los animales muestreados eran de todas las edades y no solo de edades menores de 1 año.
- ❖ En relación al sexo encontramos que hubo una mayor presencia de Sapovirus en machos que en hembras.
- ❖ Las granjas ubicadas en las zonas rurales (Chacaraseca y La Ceiba) del Municipio de León presentaron mayor positividad a Sapovirus porcino.

## 11. RECOMENDACIONES

1. Respecto a esta enfermedad se conoce muy poco en nuestro país por lo que es necesario en conjunto de autoridades sanitarias, diseñar políticas de investigación para obtener conocimientos, todo ello con el objetivo de contribuir a la salud y a la productividad del rebaño porcino y controlar el impacto que causan las infecciones por microorganismos enteropatógenos.
2. Caracterizar los genotipos de Sapovirus con el fin de ampliar la investigación y determinar los serotipos más prevalentes en cerdos en Nicaragua.
3. Ampliar tanto la zona de estudio como la muestra y el periodo de vigilancia para obtener datos de la epidemiología de esta infección en nuestro país.
4. Incluir en otras investigaciones otros agentes infecciosos asociados a procesos diarreicos como Togavirus, coronavirus y Norovirus.
5. Divulgar los resultados de este estudio entre el personal encargado y/o dueños de fincas
6. Realizar estudios sobre la relación inter especie entre Sapovirus humano y Sapovirus porcino en la población rural de Nicaragua.
7. Promover en las granjas y fincas de crianza porcina ya sea intensiva o bien de traspato, el mejoramiento de las condiciones sanitarias, manejo, hacinamiento y establecimiento de infraestructura, haciendo uso de buenas Prácticas Pecuarias.

## 12. BIBLIOGRAFIA

1. Ana C. Alcalá, Mayra A. Hidalgo, César Obando, Esmeralda Vizzi, Ferdinando Liprandi y Juan E. Ludert, Detección molecular de calicivirus entéricos de bovino en Venezuela, Acta Científica Venezolana, 2003, Centro de Microbiología y Biología Celular, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Caracas; Laboratorio de Virología, Instituto de Investigaciones Veterinarias (IIV), INIA, Maracay; Venezuela.
2. Aline F. Barry\*; Alice F. Alfieri; Amauri A. Alfieri, Detection and phylogenetic analysis of porcine enteric calicivirus, genetically related to the Cowden strain of sapovirus genogroup III, in Brazilian swine herds, Pesq. Vet. Bras. vol.28 no.1 Rio de Janeiro Jan. 2008, URL disponible en: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-736X2008000100013](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2008000100013)
3. Cristina Rius Gibert, Helena Pañella Noguera, Características epidemiológicas de las infecciones por virus causantes de gastroenteritis aguda, Servei Epidemiologia. Agencia de Salut Pública de Barcelona cap. 2 Pág. 35, URL disponible: [http://www.cyberpunks.es/seesite/documents/dummy/265-gastroenteritis\\_agudas\\_viricas.pdf#page=35](http://www.cyberpunks.es/seesite/documents/dummy/265-gastroenteritis_agudas_viricas.pdf#page=35), 2007.
4. [Jeong C](#), [Parque SI](#), [Park SH](#), [Kim HH](#), [Park SJ](#), [Jeong JH](#), [Choy SE](#), [Saif LJ](#), [Kim SK](#), [Kang MI](#), [Hyun BH](#), [Cho KO](#), 2007 Sapoviruses la diversidad genética de la especie porcina. Bio-terapia de Recursos Humanos del Centro de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional de Chonnam, Gwangju, Corea del Sur. URL disponible: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17382492>
5. María del Carmen Varela Martínez. Gastroenteritis agudas víricas, Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III, cap. 1 Pág. 19, URL disponible en: [http://www.cyberpunks.es/seesite/documents/dummy/265-gastroenteritis\\_agudas\\_viricas.pdf#page=19](http://www.cyberpunks.es/seesite/documents/dummy/265-gastroenteritis_agudas_viricas.pdf#page=19), 2007.
6. M.P.T.P. Xavier, S.A. Oliveira, M.S.R. Ferreira, M. Victoria, V. Miranda, M.F.M. Silva, A. Strina, M.L. Barreto, M.P. Miagostovicht<sup>1</sup> and J.P.G. Leite, Detection of caliciviruses associated with acute infantile gastroenteritis in Salvador, an urban center in Northeast Brazil, Braz J Med Biol Res vol.42 no.5 Ribeirão Preto May 2009, URL disponible en: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-879X2009000500007](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2009000500007)

7. Patricio Berrios-Etchegaray. Detection and characterization of porcine sapovirus from asymptomatic animals in Irish farms. *Veterinary Microbiology* 139: 176-182, 2009. URL disponible: <http://virusberriostecheharay.blogspot.com/2009/12/virus-porcinos-4-deteccion-de-sapovirus>
8. Qiu-Hong Wang, Veronica Costantini, Linda J. Saif. Porcine enteric caliciviruses: Genetic and antigenic relatedness to human caliciviruses, diagnosis and epidemiology. *ScienceDirect. Vaccine* 25 (2007) 5453–5466. URL disponible: <http://www.sciencedirect.com>
9. V. Martella, E. Lorusso, K. Banyai, N. Decaro, M. Corrente, G. Elia, A. Cavalli, A. Radogna, V. Costantini, L. J. Saif, A. Lavazza, L. Di Trani, y C. Buonavoglia 2008, La identificación de un calicivirus porcinos genéticamente relacionadas a Sapovirus Humanos, *American Society for Microbiology*. URL disponible: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2446860>
10. X. Jiang, P.W. Huang, W.M. Zhong, T. Farkas, D.W. Cubitt, D.O. Matson, Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk and Sapporo like caliciviruses by Rt-PCR, *Journal of Virological Methods* 83 (1999) 145-154, URL disponible en: [www.elsevier.com/locate/jviromet](http://www.elsevier.com/locate/jviromet).
11. Miriam Álvarez, Javier Buesa, Javier Castillo, Jordi Vila; *Procedimientos en Microbiología Clínica, Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales, Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 2008; URL disponible: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap30.asp#428c>
12. Libro: Grant S. Hansman<sup>1</sup>, Xi Jason Jiang<sup>2</sup> y Kim Y. Green<sup>3</sup>, *Caliciviruses: Virología molecular y celular*, Editor: Prensas Académicas de Caister, 2010 pag:238, URL disponible en: <http://www.horizonpress.com/calicivirus>
13. Grant S. Hansman, Setsuko Ishida, Shima Yoshizumi, Masahiro Miyoshi, Tetsuya Ikeda, Tomoichiro Oka, and Naokazu Takeda, *Recombinant Sapovirus Gastroenteritis*, Japan; National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan; and Hokkaido Institute of Public Health, Hokkaido, Japan, Volume 13, Number 5 May 2007; URL disponible en: <http://www.cdc.gov/eid/content/13/5/786.htm>
14. Stephen W. B. Fullerton, Martina Blaschke, Bruno Coutard, Julia Gebhardt, Alexander Gorbalenya, Bruno Canard, Paul A. Tucker, and Jacques Rohayem; *Structural and Functional Characterization of Sapovirus RNA-Dependent RNA Polymerase*; *Journal of Virology*, February 2007, p. 1858-

Detección de Sapovirus porcino mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en el municipio de León durante el periodo de Febrero-Agosto del 2009.

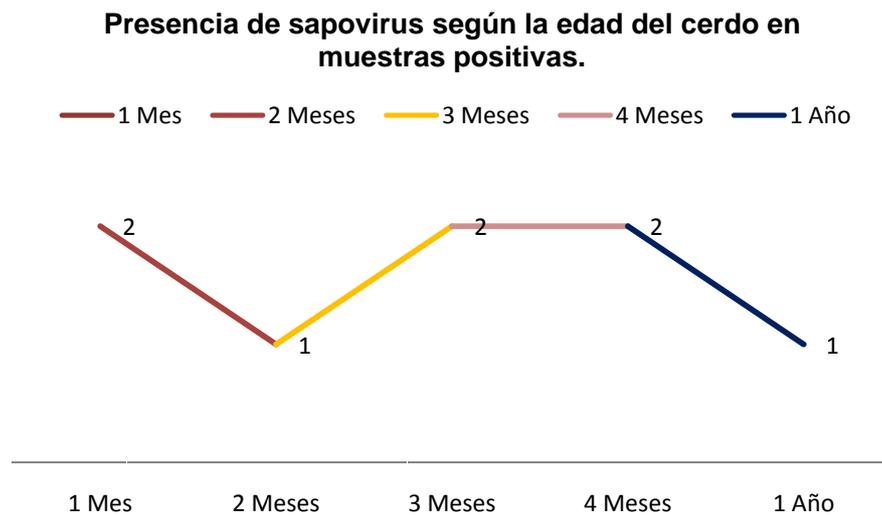
---

1871, Vol. 81, No. 4 URL disponible:  
<http://jvi.asm.org/cgi/content/full/81/4/1858>

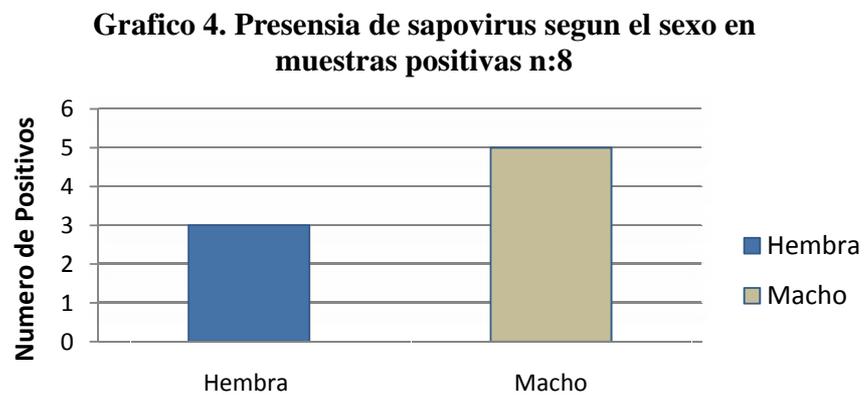
# ANEXOS

## Graficas

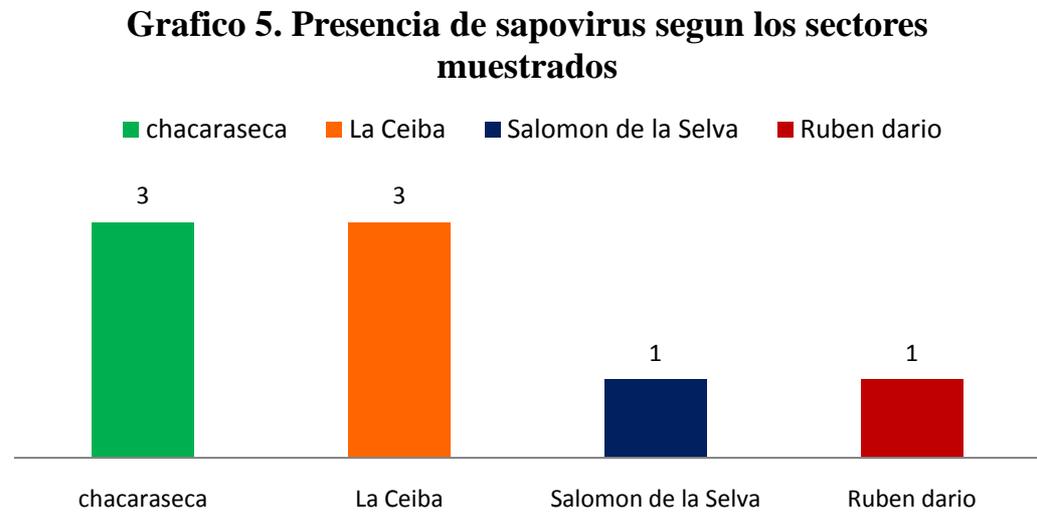
**Grafico 2.** Presencia de Sapovirus según la edad del cerdo en muestras positivas.



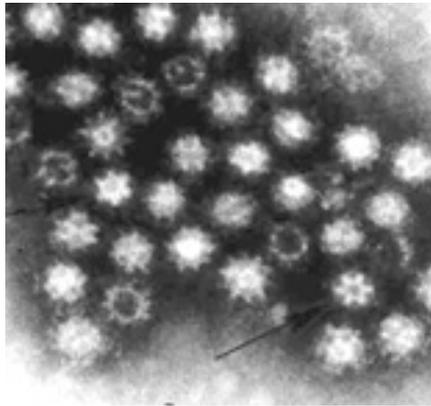
**Grafico 4.** Presencia de Sapovirus según el sexo.



**Grafico 5.** Presencia de Sapovirus según los sectores muestreados



## Imagen de Sapovirus



**PorcineEntericCalicivirus- Sapovirus**

**FICHA UTILIZADA EN EL ESTUDIO**  
**Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua**  
**Facultad de Ciencias Médicas**  
**Escuela de Medicina Veterinaria**  
**Estudio de Sapovirus porcino en el Municipio de León**

**Datos Generales**

Fecha:    /    /

Código de Vivienda: \_\_\_\_\_ Código de Campo: \_\_\_\_\_ Código de laboratorio: \_\_\_\_\_

Dirección:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Nombre \_\_\_\_\_ del \_\_\_\_\_ Propietario:

Numero de cerdos: \_\_\_\_\_

**Datos Generales del cerdo**

Nombre: \_\_\_\_\_ Identificación: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_

Sexo: M \_\_\_\_\_ H \_\_\_\_\_ Raza: \_\_\_\_\_ Peso Kg: \_\_\_\_\_

Sintomatología: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Resultados de Laboratorio**

Rt-PCR: Positivo: \_\_\_\_\_ Negativo: \_\_\_\_\_

Sapovirus: \_\_\_\_\_

Fecha:

Nombre del estudiante: \_\_\_\_\_