

GRUPE PORCINA

RESUMEN

La gripe porcina es una enfermedad vírica muy contagiosa de los cerdos. Las infecciones por el virus de la gripe porcina (SIV) causan una enfermedad respiratoria caracterizada por tos, estornudos, descargas nasales, temperatura rectal elevada, letargia, dificultades respiratorias y apetito reducido. En algunos casos, las infecciones por SIV se asocian a trastornos en la reproducción, como abortos. Los síntomas clínicos y la excreción nasal del virus pueden aparecer a las 24 horas de la infección. En infecciones por SIV las tasas de morbilidad pueden alcanzar el 100%, aunque las de mortalidad son relativamente bajas. Las infecciones bacterianas secundarias pueden agravar los síntomas clínicos de una infección por SIV. La transmisión se realiza por contacto a través de secreciones que contengan SIV, como aerosoles originados por la tos o el estornudo y por las descargas nasales.

Identificación del agente: *La identificación del virus es más fácil cuando se recogen muestras a las 24–48 horas de la aparición de los síntomas clínicos. El cerdo de elección es un animal sin tratar con manifestación aguda y temperatura rectal elevada. El virus puede detectarse fácilmente en el tejido pulmonar y en frotis nasales. El aislamiento se puede realizar en huevos embrionados de pollo y en líneas celulares continuas. El subtipado de los virus aislados se hace por pruebas de inhibición de la hemaglutinación (HI) y de inhibición de la neuraminidasa. En tejidos fijados con formalina, se puede realizar inmunohistoquímica, y en tejidos frescos, una prueba con anticuerpos fluorescentes. También existen pruebas de reacción en cadena de la polimerasa. Se han comercializado ensayos de inmunoensayos (ELISA) para la detección del virus de la gripe tipo A.*

Pruebas serológicas: *La prueba serológica más importante para la detección de anticuerpos contra el SIV es la prueba HI realizada con pares de sueros. La prueba HI es específica de subtipos. En general los sueros se recogen distanciados 10–21 días. Un aumento de cuatro veces o más entre el título de la primera muestra y la segunda sugiere una infección reciente por SIV. Otras pruebas serológicas adicionales son la prueba de inmunodifusión en gel de agar, la inmunofluorescencia indirecta, la neutralización vírica y ELISA.*

Requisitos para las vacunas y los materiales de diagnóstico: *Se han comercializado vacunas con SIV inactivado y con adyuvante. Las vacunas pueden contener un único subtipo de SIV o varios subtipos. Las vacunas deben reflejar el perfil antigénico actual de los virus de campo y contener los subtipos y cepas tan variados como sean necesarios para asegurar la protección. La vacuna final tiene que ser pura, segura, potente y eficaz.*

A. INTRODUCCIÓN

La gripe porcina es una enfermedad vírica muy contagiosa que en una piara afectada puede tener un impacto importante (5, 16). El virus de la gripe porcina (SIV) es un ortomixovirus tipo A con un genoma de ARN segmentado. Los virus de la gripe porcina tipo A se pueden subdividir según sus proteínas de la hemaglutinina y de la neuraminidasa. Los subtipos de SIV que se identifican con más frecuencia en cerdos son H1N1, H1N2 y H3N2. Otros subtipos identificados en cerdos son H1N7, H3N1, H4N6 y H9N2. Los virus H1N1, H1N2 y H3N2 de Europa son antigénica y genéticamente distintos de los encontrados en EE.UU. (1, 2, 4, 8, 12, 15, 20). Los cerdos tienen receptores en su tracto respiratorio que reconocen virus de la gripe porcina, humana y aviar. En consecuencia, los cerdos se han considerado como “recipientes de mezcla” para el desarrollo de nuevos virus de la gripe cuando los virus de la gripe porcina, aviar y/o humana se recombinan en los cerdos (13). Las infecciones por SIV causan una enfermedad respiratoria caracterizada por tos, estornudos, descargas nasales, temperaturas rectales elevadas, letargia, dificultad respiratoria y apetito disminuido. Entre los agentes que pueden originar una enfermedad respiratoria en cerdos están el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino, el virus de la

enfermedad de Aujeszky (seudorabia), el coronavirus respiratorio porcino, *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Mycoplasma hyopneumoniae*, aunque la mayoría de éstos tienen otros síntomas que no son similares a los de la gripe porcina (11). Sólo *Actinobacillus pleuropneumoniae*, en infección aguda, presenta síntomas clínicos similares a la gripe porcina, como disnea, taquipnea, respiración abdominal, tos, fiebre, depresión y anorexia. Los síntomas clínicos y la excreción nasal pueden aparecer a las 24 horas de la infección. En el cerdo se dan dos formas de la enfermedad, la epidémica o la endémica. En la forma epidémica el virus pasa por todas las fases con una recuperación rápida del cerdo si no existen factores de complicación del tipo de infecciones bacterianas secundarias. En la forma endémica los síntomas pueden ser menos aparentes, y no todos los cerdos muestran los síntomas clínicos tradicionales de la infección. En las infecciones por SIV las tasas de morbilidad pueden alcanzar el 100%, aunque las tasas de mortalidad son en general bajas. El impacto económico más importante está relacionado con la pérdida de peso, que se traduce en la necesidad de un mayor número de días para alcanzar el peso adecuado para el mercado. La transmisión se realiza por contacto con secreciones que contienen SIV, como los aerosoles que se originan por la tos y el estornudo, y por descargas nasales. Pueden darse infecciones por SIV en humanos y se han descrito algunas muertes. Deben tomarse precauciones para impedir las infecciones humanas como se describe en el Capítulo I.1.6. *Seguridad humana en los laboratorios veterinarios de microbiología.*

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

1. Identificación del agente

Como el SIV es un agente patógeno potencial para humanos, todo trabajo con tejidos infecciosos, frotis, huevos embrionados y cultivos celulares debe hacerse en cámaras de seguridad biológica de tipo II.

a) Cultivo

- **Procesamiento de muestras**

El tejido pulmonar puede prepararse para el aislamiento de virus de varias formas, por ejemplo en un mortero, en un digestor, en un homogenizador, o cortándolo con la hoja de un escalpelo o con tijeras. El procesamiento del tejido se hace en un medio de cultivo celular suplementado con antibióticos (por ejemplo, a 10 x la concentración de trabajo), a una concentración final del 10% (p/v). La suspensión se incuba 30 minutos en la oscuridad a 20–22°C. Los frotis nasales deben ponerse en medio de cultivo celular o en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Al llegar al laboratorio los frotis nasales se agitan vigorosamente a mano o en un vórtex. Tanto los frotis nasales como el tejido pulmonar se centrifugan a 1500–1.900 *g* durante 15–30 minutos a 4°C. Se recoge el sobrenadante y se guarda a 4°C hasta la inoculación. Si el sobrenadante se tiene que mantener más de 24 horas antes de la inoculación, debe guardarse a –70°C. El sobrenadante de la muestra pulmonar se inocular sin más dilución. El sobrenadante de los frotis nasales se puede inocular también sin diluir o diluido a 1/3 con medio de cultivo. Para reducir la contaminación bacteriana, se añaden antibióticos al medio de cultivo celular utilizado en el procesamiento y/o el sobrenadante se filtra, aunque esto puede disminuir el título vírico.

- **Aislamiento del virus en cultivo celular**

- i) El aislamiento del virus se realiza en líneas celulares susceptibles de infección por SIV. La línea celular preferida es la Madin–Darby de riñón canino (MDCK), pero pueden emplearse líneas celulares primarias de riñón o de testículo porcino, o del epitelio pulmonar.
- ii) Lavar tres veces las monocapas celulares confluentes (48–72 horas después de la puesta en cultivo de las células) con medio de cultivo celular que contenga una concentración final de 2 µg/ml de tripsina; la concentración depende del tipo de tripsina y puede utilizarse hasta 10 µg/ml. El medio se puede suplementar con antibióticos, pero no con suero fetal bovino.
- iii) Inocular el cultivo celular con una cantidad adecuada de sobrenadante de suspensión de tejido o de frotis. Nota: el volumen de inóculo varía con el tamaño del recipiente del cultivo celular. En general se inoculan de 100–200 µl en cada pocillo de una placa de cultivo de 24 pocillos, 1 ml en cada tubo Leighton, y 1–2 ml en una botella de 25 cm².
- iv) Incubar los cultivos celulares inoculados durante 1–2 horas a 37°C. Cuando se usan cultivos celulares abiertos al medio, como placas de cultivo, la incubación se debe realizar en una cámara húmeda con 5% de CO₂.
- v) Eliminar el inóculo y lavar la monocapa tres veces con el medio de cultivo que contiene tripsina.
- vi) Añadir un volumen apropiado de medio de cultivo de mantenimiento a todos los recipientes e incubar a 37°C durante 7 días con examen periódico del efecto citopático (ECP). Si al final del período de

incubación no se observa ECP, el cultivo celular se congela a -70°C , se descongela, y se siembra de nuevo como se describió antes (paso iii). Si se observa ECP, se puede probar una alícuota del medio de cultivo para detectar virus hemaglutinantes y se puede recoger y utilizar como inóculo para confirmación por la técnica de inmunofluorescencia (ver Sección B.1.e. más adelante). Para este fin se pueden inocular monocapas de MDCK (o de otra línea celular adecuada) en cubres (tubo Leighton, placa de cultivo celular de 24 pocillos) o en portas con cámaras. El procedimiento de aislamiento es como se describió arriba (paso iii). En algunos casos puede ser necesario hacer diluciones decimales del virus del cultivo celular para tener un ECP apropiado en los cubres. Los subtipos de la gripe se pueden determinar por las pruebas de inhibición de la hemaglutinación (HI) y de inhibición de la neuraminidasa (NI).

- **Inoculación en huevo (14)**

- i) Emplear huevos embrionados de pollo de 10–11 días.
- ii) Inocular 0,1–0,3 ml de inóculo en la cavidad alantoidea y en el saco amniótico; muchos laboratorios inoculan sólo por la vía alantoidea con una sensibilidad similar. Generalmente se inoculan 4 huevos por muestra.
- iii) Incubar los huevos a $35\text{--}37^{\circ}\text{C}$ durante 3–4 días y mirarlos al trasluz diariamente. Los huevos con embriones muertos antes de las 24 horas de inoculación se desechan.
- iv) Refrigerar los huevos con embriones muertos después de 24 horas de la inoculación. Recoger el líquido amniótico y alantoideo de los huevos con embriones muertos y de los huevos con embriones viables al fin del período de incubación. Este material debe considerarse potencialmente infeccioso y tratarse adecuadamente para evitar la exposición al SIV del laborante.
- v) Centrifugar los líquidos a 1.500–1.900 *g* durante 10–20 minutos a 4°C . Pasar el sobrenadante a otro tubo para prueba.
- vi) Se evalúan los líquidos para presencia de SIV con la prueba de hemaglutinación (HA) (ver más adelante).
- vii) Repasar los líquidos negativos para actividad hemaglutinante (negativos para SIV) en huevos o en líneas celulares como se describió antes. El aislamiento puede mejorarse haciendo diluciones decimales del líquido en medio de cultivo. Se pueden añadir antibióticos al medio de cultivo.

- **Prueba de hemaglutinación**

- i) Preparar una suspensión al 0,5% de eritrocitos de sangre de pavo macho o de pollo; la sangre de pavo macho se utiliza en algunos laboratorios de EE.UU. pero no se recomienda para identificar aislamientos europeos. Los eritrocitos lavados y las suspensiones al 0,5% se pueden guardar a 4°C hasta una semana. Eliminarlos si se observa hemólisis.
- ii) Para cada virus desconocido, distribuir 50 μl de PBS en una fila de 12 pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos con fondo en V o en U. Debe incluirse como control otra línea de pocillos.
- iii) Añadir 50 μl de aislamiento sin diluir al primer pocillo de cada fila correspondiente.
- iv) Con una micropipeta, diluir en serie el aislamiento en volúmenes de 50 μl . Las diluciones resultantes variarán de $\frac{1}{2}$ (pocillo 1) a $1/2048$ (pocillo 11). El pocillo 12 contiene sólo PBS y sirve como control de células.
- v) Añadir a cada pocillo 50 μl de suspensión de eritrocitos al 0,5% y agitar la placa para mezclar bien. Nota: mantener los eritrocitos suspendidos cuidadosamente durante el proceso de distribución.
- vi) Cerrar la placa con cinta aislante e incubar a temperatura ambiente hasta que en el pocillo control se forme un botón definido (30–60 minutos).
- vii) Los pocillos con hemaglutinación completa (HA positiva, SIV presente) muestran los eritrocitos distribuidos por todo el pocillo formando una “alfombra”. Los pocillos con un botón definido de eritrocitos en el fondo del pocillo son negativos para actividad hemaglutinante (negativos para SIV). Una actividad HA incompleta se manifiesta por botones parciales caracterizados por márgenes difusos o con apariencia de “donut”. Cuando la interpretación entre completa e incompleta es dudosa, se voltea la placa con un ángulo de aproximadamente 45°C durante 20–30 segundos y se observa el arrastre de los eritrocitos, que en el caso de pocillos con inhibición completa produce una apariencia de lágrimas translúcidas alrededor de las células. Los pocillos con inhibición parcial no producirán arrastre en lágrima.

b) Tipificación de aislamientos de SIV

• **Prueba de inhibición de la hemaglutinación**

- i) Diluir los antígenos HA de referencia (H1, H3, etc.) a una concentración de 8 unidades HA (HAU) por 50 µl (4 HAU/ 25µl) en PBS 0,01 M, pH 7.
- ii) Estandarizar los virus desconocidos de gripe A para que contengan 8 HAU en 50 µl.
- iii) Realizar una titulación (prueba HA) con todos los aislamientos desconocidos y los antígenos de subtipo H para confirmar que están presentes las HAUs correctas. Esta titulación se realiza como se describe en el procedimiento para HA excepto que se emplean seis pocillos en vez de once.
- iv) Tratar el suero con RDE; añadir 50 µl de suero a 200 µl de RDE (enzima destructora de los receptores; dilución 1/10 en solución salina con calcio equivalente a 100 unidades por ml). Incubar durante la noche (12–18 horas) en un baño de agua a 37°C. Añadir 150 µl de solución de citrato sódico al 2,5% e inactivar por calor durante 30 minutos a 56°C. Nota: se recomienda el tratamiento con RDE ya que elimina la hemaglutinación inespecífica y favorece la identificación de aislamientos H1N2 y H3N2.
- v) Eliminar las aglutininas naturales del suero, tratando el suero diluido con 0,1 ml de eritrocitos lavados y empaquetados por cada 1 ml de suero diluido. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente con mezcla ocasional para mantener los eritrocitos suspendidos. Centrifugar el suero tratado a 800 g durante 10 minutos y conservar el suero.
- vi) Añadir 25 µl de antígeno estandarizado (aislamiento desconocido o control positivo de antígeno) a tres pocillos de una placa de microtitulación con 96 pocillos de fondo en V o en U. Añadir 50 µl de PBS a varios pocillos para servir como control de eritrocitos. Nota: se pueden utilizar 25 µl de PBS en lugar de los 25 µl de antígeno estandarizado.
- vii) Añadir 25 µl del antisuero adecuado estandarizado al primer pocillo del subtipo H evaluado. Hacer diluciones seriadas del antisuero en volúmenes de 25 µl en los pocillos del antígeno con una pipeta de 25 µl. Repetir este procedimiento para cada subtipo H evaluado. Nota: si se utilizaron 25 µl de PBS en lugar de los 25 µl del antígeno estandarizado en el paso vi, se añaden 25 µl del antígeno estandarizado a cada pocillo que contenga el antisuero estandarizado.
- viii) Cubrir la(s) placa(s) e incubar a temperatura ambiente durante 20–60 minutos.
- ix) Añadir 50 µl de suspensión de eritrocitos al 0,5% a cada pocillo y agitar la(s) placa(s) para mezclar bien. Mantener los eritrocitos en suspensión durante el proceso de distribución.
- x) Cubrir la(s) placa(s) con cinta aislante e incubar a temperatura ambiente hasta que se forme un botón definido en los pocillos de control positivo (normalmente 30–60 minutos). Observar las placas después de 20 minutos de incubación para hemaglutinación ya que algunos aislamientos pueden comenzar a eluirse (separarse de los eritrocitos) a los 30 minutos.
- xi) Leer los resultados de la prueba como se describió antes para la prueba HA. Una muestra se considera positiva para un determinado subtipo H si se inhibe la hemaglutinación. La prueba se considera válida si el antígeno positivo de referencia y su antígeno homólogo muestran el título HI esperado y si la titulación de cada antígeno (desconocido y control positivo) es 8 HAUs. Si no se presentan estas condiciones, la prueba debe repetirse.
- xii) Si los eritrocitos en los pocillos de células control no sedimentan en un botón bien definido, comprobar como posibles causas: una composición incorrecta del PBS, evaporación excesiva de las placas, eritrocitos demasiado viejos, o concentración incorrecta de eritrocitos.

• **Prueba de inhibición de la neuraminidasa**

La identificación de subtipos basada en la prueba NI supera las disponibilidades de muchos laboratorios. Para la tipificación de los aislamientos en cuanto a N, se debe consultar a los laboratorios de referencia.

c) Prueba de inmunofluorescencia

- i) Esta técnica se puede utilizar en cortes de tejidos o en cubres/portas con monocapas celulares infectadas. Se deben incluir controles positivos y negativos con todos los procedimientos de tinción.
- ii) Las células inoculadas se incuban lo suficiente para permitir que el 10–25% de las células se infecten por el virus. Lavar los cubres o portas con PBS una vez, colocarlos durante 5–10 minutos en acetona al 100% y secar al aire. La acetona debe utilizarse en una cámara aireada.
- iii) Preparar cortes congelados de tejido en portas de vidrio. Fijar los portas con acetona durante 5–10 minutos y secar al aire.

- iv) Aplicar el conjugado (anticuerpo contra la gripe porcina marcado con fluoresceína) e incubar en una cámara húmeda a 37°C durante 37 minutos.
- v) Lavar con PBS, pH 7,2, inundar durante 5–10 minutos con PBS, lavar con agua destilada y secar al aire.
- vi) Colocar los cubres sobre portas de vidrio con las células hacia abajo, con líquido de montaje. Extraer la goma de ajuste de las cámaras de los portas y añadir líquido de montaje y después un cubre. Hacer lo mismo para montar los cortes de tejido en portas.
- vii) En una habitación oscura, observar los portas teñidos con un microscopio de luz ultravioleta. Las células infectadas con SIV se identifican por una fluorescencia brillante verde manzana. Se recomienda que la persona que examine las muestras tenga experiencia en la observación de muestras marcadas con fluoresceína ya que pueden ser difíciles de interpretar.

d) Inmunoquímica (19)

- i) Cortar pulmón fijado con formalina e incluido en parafina en secciones de 4 µm de grosor y colocarlas en portas recubiertos de poli-L-lisina. Con todas las pruebas deben incluirse controles de tejido positivo y negativo.
- ii) Calentar los portas a 60°C durante 15 minutos, eliminar la parafina, y rehidratar por inmersiones en concentraciones decrecientes de etanol y luego en agua destilada.
- iii) Tratar las muestras con peróxido de hidrógeno al 3% durante 10 minutos y lavar dos veces con agua destilada.
- iv) Digerir las muestras con proteasa al 0,05% durante 2 minutos y lavar dos veces durante 2 minutos con tampón Tris/PBS 0,1 M, pH 7,2, a temperatura ambiente.
- v) Aplicar a cada porta el anticuerpo monoclonal primario anti-SIV de ratón (dirigido contra la nucleoproteína vírica) e incubar durante 1 hora a temperatura ambiente o durante la noche a 4°C. Lavar los portas con tampón Tris/PBS.
- vi) Aplicar el anticuerpo secundario (anticuerpo biotinilado anti-ratón de cabra) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Lavar con tampón Tris/PBS.
- vii) Aplicar el anticuerpo terciario (estreptavidina conjugada con peroxidasa) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Lavar con tampón Tris/PBS.
- viii) Añadir la solución de tetrahidrocloreto de diaminobenzidina durante 5 minutos a temperatura ambiente. Lavar dos veces con agua destilada.
- ix) Teñir los portas para contraste con la hematoxilina de Gill durante 10–30 segundos, lavar con agua durante 2 minutos, deshidratar, limpiar y añadir cubres.
- x) Los tejidos infectados con SIV se identifican por la presencia de una coloración marrón en el epitelio bronquiolar y en los neumocitos.

e) Enzoinmunoensayo con antígeno de captura

Se han comercializado enzoinmunoensayos con antígeno de tipo A de captura (ELISAs) para la detección de virus de la gripe humana. Este tipo de pruebas se han utilizado también para detectar SIV en tejido pulmonar y en frotis nasales (10, 17). Las pruebas están generalmente disponibles en compañías del sector de la salud humana.

f) Reacción en cadena de la polimerasa

Se han desarrollado pruebas de reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de la gripe porcina (6). No se dispone en la actualidad de una información amplia sobre la validación de estas pruebas.

2. Pruebas serológicas

La prueba serológica fundamental para la detección de anticuerpos frente al SIV es la prueba HI que es específica de subtipos. Debe realizarse sobre sueros pareados recogidos con una separación de 10–21 días. Un aumento de cuatro veces o más en el título entre la primera y la segunda muestra indica una infección reciente por SIV. Otras pruebas serológicas que se han descrito, pero que generalmente no se utilizan, son la neutralización vírica, la inmunodifusión en medio sólido y la inmunofluorescencia indirecta. Se ha descrito en la literatura la tecnología ELISA para la detección de anticuerpos frente a SIV y al menos existe en el mercado un kit comercial. La validación de las pruebas ELISA está en marcha.

• **Prueba de inhibición de la hemaglutinación**

- i) Diluir los antígenos HA de referencia (H1, H3, etc.) hasta una concentración de 4–8 HAU/25 µl con PBS 0,01 M, pH 7,2.
- ii) *Prueba con H1N1*: Inactivar los sueros por calor durante 30 minutos a 56°C. Diluir a 1/10 con PBS. Añadir 0,1 ml de eritrocitos lavados y empaquetados de pollo macho a 1 ml de suero inactivado por calor y diluido, mezclando a continuación. Incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos con agitación periódica cada 10–15 minutos. Centrifugar a 800 **g** durante 10 minutos a 4°C. Nota: como alternativa a la inactivación por calor y el tratamiento con eritrocitos empaquetados de pollo, los sueros se pueden tratar con RDR y con eritrocitos de pollo como se describe más adelante en el paso iii.
- iii) *Prueba con H1N2 y H3N2*: Añadir 50 µl de suero a 200 µl de RDE (enzima destructora de los receptores; dilución 1/10 en solución salina con calcio presentando 100 unidades por ml). Incubar durante la noche (12–18 horas) en un baño de agua a 37°C. Añadir 150 µl de solución de citrato sódico al 2,5% e inactivar por calor durante 30 minutos a 56°C. Combinar 200 µl de muestra tratada con 25 µl de PBS. Añadir 50 µl de eritrocitos de pollo o pavo macho al 50% para una dilución final del suero de 1/10. Agitar e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente o durante la noche a 4°C. Nota: son preferibles los eritrocitos de pollo para todos los aislamientos europeos.
- iv) Depositar 50 µl de suero tratado en dos pocillos con fondo en V o en U de una placa con 96 pocillos. Depositar 25 µl de suero tratado en dos pocillos para utilizarlos como control de suero. Los sueros control positivos y negativos se tratan del mismo modo que los sueros desconocidos.
- v) Depositar 25 µl de PBS en los pocillos de control de suero y en todos los pocillos vacíos excepto en los dos pocillos identificados como control de células. Añadir 50 µl de PBS a los pocillos de control de células.
- vi) Hacer diluciones seriadas dobles del suero en volúmenes de 25 µl en la placa, y después añadir 25 µl del antígeno apropiado a todos los pocillos de la prueba excepto a los que corresponden a control de suero y control de células.
- vii) Incubar las placas cerradas a temperatura ambiente durante 30–60 minutos.
- viii) Añadir 50 µl de suspensión de eritrocitos al 0,5% (de pollo para H1N1 y de pavo para H3N2) a cada pocillo, agitar, e incubar a temperatura ambiente durante 20–30 minutos hasta que se forme un botón definido en el fondo de los pocillos de control de células. Mantener los eritrocitos en suspensión durante el proceso de distribución.
- ix) Realizar una prueba HA utilizando los antígenos de la prueba HI antes de –y simultáneamente a– la prueba HI, para verificar que las concentraciones de antígeno son las apropiadas.
- x) Para que la prueba sea válida no debe haber hemaglutinación en el pocillo de control de suero, ni debe haber inhibición de la hemaglutinación con el suero negativo, además el suero positivo debe tener su título HI anticipado y la titulación HA debe indicar 4–8 HAU por 25 µl.

b) Enzimoinmunoensayo (9)

Se ha descrito en la literatura la tecnología ELISA para detección de anticuerpos frente a SIV. Al menos una prueba ELISA está disponible en forma de kit comercial.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS Y LOS MATERIALES DE DIAGNÓSTICO

Las directrices para la producción de vacunas veterinarias se presentan en el Capítulo I.1.7. *Principios de producción de vacunas veterinarias*. Las normas indicadas aquí y en el Capítulo I.1.7 son de tipo general y pueden suplementarse con requisitos nacionales y regionales.

1. Control de inóculos

a) Características del inóculo

La identidad del inóculo debe estar bien documentada, incluyendo el origen y la historia de países del agente. Deben establecerse todas las propiedades definitorias tales como subtipos de hemaglutinina y neuraminidasa. Para establecer los subtipos de H y de N se puede utilizar la inhibición de la hemaglutinación y la inhibición de la neuraminidasa por antisueros específicos de subgrupo. También, se pueden neutralizar alícuotas del virus de siembra original con antisueros específicos, como antisuero producido contra SIV H1N1 o SIV H3N2, y después inocular en el saco alantoideo de huevos embrionados de pollo de 10 días o en líneas celulares susceptibles, como la MDCK. El líquido alantoideo o el sobrenadante del cultivo celular se recoge después de 72–96 horas de incubación y se prueba para

actividad HA. La identidad se demuestra por la falta de actividad HA en el inóculo neutralizado, y la presencia de actividad HA en el no neutralizado. Las diferencias antigénicas presentes en una cepa dada, que la diferencie de otros miembros del subtipo y que puedan tener un impacto beneficioso en su empleo como vacuna, deben confirmarse por secuenciación y análisis genético.

b) Método de cultivo

El inóculo de SIV se puede cultivar en huevos o en cultivo celular. La selección de un método de cultivo depende del grado de adaptación del virus, crecimiento en el medio, velocidad de mutación, y rendimiento vírico en el sistema específico de cultivo. Los productos de la vacuna contra el SIV deben limitarse a cinco pases del inóculo original para evitar variación antigénica.

c) Validación del cultivo

Debe demostrarse la pureza del inóculo y de las células utilizadas para la producción de vacuna. El inóculo original debe estar libre de agentes exógenos, bacterias o micoplasmas, usando pruebas que se sepa que son sensibles para detectar estos organismos. La alícuota de prueba debe ser representativa de un título adecuado para producción de vacuna, pero no tan alto como para que un suero hiperinmune sea incapaz de neutralizar el virus del inóculo en una prueba para pureza. El virus de siembra se neutraliza con suero mono-específico o con anticuerpo monoclonal contra el SIV y la mezcla virus/anticuerpo se cultiva en varios tipos de líneas celulares en monocapa. Los cultivos se subcultivan en pases cada 7 días, por lo menos durante 14 días, cuando se prueban para agentes citopatogénicos y hemadsorbentes. Las células también se examinan para otros virus que puedan haber infectado las células o el inóculo en pases previos. Los contaminantes potenciales son el virus de la diarrea bovina vírica, reovirus, virus de la rabia, virus de la enfermedad de Aujeszky (seudorabia), virus de la gastroenteritis transmisible, coronavirus respiratorio porcino, parvovirus porcinos, adenovirus porcinos, virus de la encefalomiелitis hemaglutinante, rotavirus porcinos, circovirus porcinos, y virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino. Las líneas celulares en las que se prueba el inóculo incluyen: una línea celular de riñón de mono verde africano (Vero) (para rabia y reovirus), una línea celular porcina, una línea celular de la especie de células utilizada para propagar el inóculo, si no es de origen porcino, y líneas celulares de cualquier otra especie por las que se haya pasado el inóculo. Además, se recomienda una línea celular muy permisiva para el virus de la diarrea bovina vírica, tipos 1 y 2. El virus de la diarrea bovina vírica es un contaminante potencial introducido por el empleo del suero bovino fetal en los sistemas de cultivo celular.

Deben investigarse los factores que pueden contribuir a la inestabilidad durante la producción, como la replicación en una línea celular no común. Si se aprueba la producción para cinco pases desde el inóculo original, debe garantizarse la secuenciación de los genes H y N al número máximo de pases para confirmar la estabilidad del inóculo vírico.

d) Validación como vacuna

Las vacunas candidatas deben ser puras, seguras, potentes y eficaces.

Las cepas utilizadas en la producción de vacunas deben estar relacionadas antigénicamente con las cepas de SIV que circulan en el campo (3, 7, 18). Para la selección pueden utilizarse las pruebas de inhibición de la hemaglutinación y de neutralización que demuestren reacción cruzada entre antisueros de animales vacunados con la cepa vacunal candidata y aislamientos actuales de campo. Un estudio de vacunación/desafío en el cerdo, utilizando cepas de desafío homólogas y heterólogas, indicará el grado de protección aportado por la vacuna. Los cerdos utilizados en estos estudios deben estar libres de anticuerpos contra el SIV. Los estudios sobre vacunación/desafío deben realizarse con virus producido según el método previsto de fabricación, al máximo número de pases del virus permitido, y con cerdos de la edad mínima recomendada en la etiqueta de la vacuna. Inicialmente, los lotes se componen de varias cantidades de antígenos. El lote problema que contenga la menor cantidad de antígeno que confiera protección es el estándar frente al que se miden los lotes de la futura producción. El mejor criterio para ensayos de evaluaciones de grupos de tratamiento es una notable reducción de virus (títulos y duración de la excreción) en el tracto respiratorio de cerdos vacunados. También son criterios las diferencias en la observación clínica de lesiones pulmonares. Si se emplean métodos *in vivo* o *in vitro* para determinar la potencia de cada lote de producción de vacuna, los ensayos deben hacerse en paralelo con estudios del antígeno mínimo para establecer criterios de puesta de la vacuna en el mercado. En algunos países se dispone de vacunas combinadas que contienen más de una cepa de SIV. La eficacia de los diferentes componentes de estas vacunas debe establecerse independientemente y en combinación, en caso de que exista interferencia entre los distintos antígenos.

2. Método de producción

Una vez que la vacuna se muestra eficaz, y que las condiciones de fabricación propuestas resultan aceptables a las autoridades competentes, se puede obtener la aprobación para la producción de la vacuna. En general, los sistemas de monocapa o de suspensión celular a gran escala operan bajo estrictas condiciones asépticas

controladas por temperatura y con métodos definidos de producción que aseguran una repetición de lote a lote. Cuando el virus alcanza su título máximo, determinado por HA, ECP, inmunofluorescencia u otra técnica aprobada, el virus se clarifica, se filtra y se inactiva. Se han utilizado con éxito varios agentes inactivantes, como formalina y etilenimina binaria. Debe realizarse un estudio de la cinética de inactivación con el agente inactivador aprobado, en un lote de virus con un título mayor que el título máximo de producción y crecido en las condiciones del método de producción aprobado. Este estudio debe demostrar que el método de inactivación es adecuado y asegura la inactivación completa del virus. Las muestras tomadas a intervalos durante la inactivación, cuando se inoculan en una línea celular susceptible o en el saco alantoideo de huevos embrionados, deben indicar una pérdida lineal y completa del título al final del proceso de inactivación. Esto supone menos de una partícula infecciosa por cada 10^4 litros de líquidos después de la inactivación. Generalmente se añade un adyuvante para aumentar la respuesta inmune. A menudo, el adyuvante es un aceite mineral, aunque otros adyuvantes pueden ser igualmente eficaces.

3. Control del proceso

Los cultivos celulares deben comprobarse macroscópicamente para descartar anomalías o signos de contaminación y se deben desechar si no resultan satisfactorios. Un lote está listo para la recogida cuando el ECP vírico alcanza el 80–100%. La concentración de virus se puede determinar utilizando la masa de antígeno o ensayos de infectividad.

4. Control de lotes

a) Esterilidad

Durante la producción se deben realizar pruebas para contaminación por bacterias, micoplasmas y hongos, tanto en los lotes de recogida de vacunas inactivadas como en los de vivas, y se deben confirmar en el producto final (ver Capítulo 1.1.5.).

b) Inocuidad

Para evaluar la inocuidad de un producto inactivado se pueden emplear ratones o cobayas. En un modelo, se inoculan ocho ratones intraperitonealmente o subcutáneamente con 0,5 ml y se observan durante 7 días. La prueba de inocuidad en ratón puede no ser aplicable cuando se usan ciertos adyuvantes, especialmente productos derivados de saponina. En otro modelo, dos cobayas se inyectan con una dosis de 2 ml cada una intramuscularmente o subcutáneamente y se observan durante 7 días. La aparición de síntomas clínicos adversos o de mortalidad atribuibles a la vacuna indican que el lote no es aceptable para uso. La inactivación completa del virus en un producto inactivado puede determinarse por múltiples pases de los líquidos producidos, después de la inactivación y antes de la adición de adyuvante, en cultivos celulares o en huevos, seguidos de pruebas HA para detectar la presencia de virus.

El producto final puede examinarse en el animal hospedador utilizando dos animales de la edad mínima para la que se recomendada su empleo, de acuerdo con las instrucciones dadas en el prospecto del producto; los animales se observan durante 21 días. También se recomiendan estudios de inocuidad en el campo sobre animales vacunados, en un mínimo de tres áreas geográficas distintas y al menos con 300 animales por área. Si la vacuna se utiliza en cerdos destinados al mercado para consumo humano, debe establecerse un tiempo de aislamiento en consonancia con el adyuvante empleado (generalmente 21 días) por medio de examen histopatológico enviado a las autoridades competentes en seguridad alimentaria.

c) Potencia

Para establecer que durante la producción se alcanzan los títulos mínimos, se mide el contenido antigénico. Generalmente, el contenido antigénico se mide antes de la inactivación y previamente a cualquier proceso posterior. Entre las pruebas que pueden utilizarse para determinar el contenido antigénico en el producto final están ELISA para potencia relativa, HA y HI. Es necesario confirmar la sensibilidad, especificidad, reproducibilidad y severidad de tales pruebas.

d) Duración de la inmunidad

Antes de que se apruebe un producto, debe determinarse la duración de la inmunidad y la frecuencia de vacunación recomendada. En principio, esta información se adquiere directamente de estudios de vacunación y desafío utilizando el animal hospedador. El período de protección demostrada, medido por la capacidad de los animales vacunados para resistir inoculaciones de desafío en una prueba validada, se puede especificar en las indicaciones del prospecto de la vacuna comercial. Una vez que se ha identificado una prueba de potencia adecuada, si la deriva antigénica requiriera reemplazar las cepas de la vacuna, se pueden examinar cepas del mismo subtipo en el animal hospedador o en un modelo apropiado de animal de

laboratorio. Sin embargo, las cepas circulantes pueden mostrar diferencias antigénicas notables con la cepa vacunal, pero la cepa vacunal puede suministrar aún protección. También, puede que la vacuna no proteja contra una nueva cepa que parece antigénicamente similar a la de la vacuna. En consecuencia, parece que la eficacia de las cepas vacunales siempre tiene que ser evaluada en el cerdo.

e) Estabilidad

Las vacunas deben guardarse a 4°C ± 2°C con una exposición mínima a la luz. La caducidad debe determinarse utilizando, a lo largo del período de validez propuesto, la prueba aprobada de potencia (Sección C.5.b.).

f) Conservantes

El conservante más común es el timerosal a una concentración que no supere el 0,01% (1/10.000). La adición de timerosal o de otros compuestos mercuriales debe evitarse en lo posible. Además, en el producto final pueden estar presentes antibióticos residuales del medio de cultivo celular en cantidades restringidas. Por ejemplo, la gentamicina residual no debe exceder de 30 mcg por ml de vacuna.

g) Precauciones

Las vacunas inactivadas contra el SIV no presentan un peligro especial para el usuario, aunque la inoculación accidental puede originar una reacción adversa debido al adyuvante y a componentes secundarios de la vacuna. En general, con vacunas inactivadas contra el SIV pueden vacunarse con seguridad los cerdos sanos destetados y las cerdas grávidas en cualquier fase de gestación.

5. Pruebas sobre el producto final

a) Inocuidad

Las muestras de los recipientes finales con el producto completo de las vacunas inactivadas deben probarse en ratones jóvenes como se describe en la Sección C.4.b.

b) Potencia

Para evaluar los nuevos lotes que se comercializan, debe utilizarse la prueba de potencia que se establece al estudiar la protección con el mínimo de antígeno. Se necesita que la prueba sea específica y reproducible. Debe detectar con fiabilidad las vacunas que no son suficientemente potentes. Si se utiliza serología de animales de laboratorio en vez de serología del cerdo, debe demostrarse primero que la vacunación de los animales de laboratorio induce una respuesta específica, sensible y dependiente de la dosis según se mide en la prueba de potencia, y que se correlaciona con la protección en el cerdo (Sección C.1.d.).

REFERENCIAS

1. BROWN I.H., HARRIS P.A., MCCAULERY J.M. & ALEXANDER D.J. (1998). Multiple genetic reassortment of avian and human influenza A viruses in European pigs, resulting in the emergence of the H1N2 virus of novel genotype. *J. Gen. Virol.*, **79**, 2947–2955.
2. CASTRUCCI M.R., DONATELLI I., SIDOLI L., BARIGAZZI G., KAWAOKA Y. & WEBSTER R.G. (1993). Genetic reassortment between avian and human influenza A viruses in Italian pigs. *Virology*, **193**, 503–506.
3. DE JONG J.C., VAN NIEUWSTADT A.P., KIMMAN T.G., LOEFFEN W.L., BESTEBROER T.M., BIJLSMA K., VERWEIJ C., OSTERHAUS A.D. & CLASS E.C. (1999). Antigenic drift in swine influenza H3 haemagglutinins with implications for vaccination policy. *Vaccine*, **17**, 1321–1328.
4. DONE S.H. & BROWN I.H. (1997). Swine influenza in the United Kingdom, past and present. *Large Anim. Pract.*, **2**, 20–28.
5. EASTERDAY B.C. & VAN REETH K. (1999). Swine influenza. *In: Diseases of Swine*, Straw B.E., D’Allaire S., Mengeling W.L. & Taylor D.J., eds. Iowa State University Press, Iowa, USA, 277–290.
6. FOUCHIER R.A., BESTEBROER T.M., HERFST S., VAN DER KEMP L., RIMMELZWAAN G.F. & OSTERHAUS A.D. (2000). Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 4096–4101.

7. HEINEN P.P., VAN NIEUWSTADT A.P., DE BOER–LUIJTZE E.A. & BIANCHI A.T.J. (2001). Analysis of the quality of protection induced by a porcine influenza A vaccine to challenge with an H3N2 virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **82**, 39–56.
8. KARASIN A.I., LANDGRAF J., SWENSON S., ERICKSON G., GOYAL S., WOODRUFF M., SCHERBA G., ANDERSON G. & OLSEN C.W. (2002). Genetic characterization of H1N2 influenza A viruses isolated from pigs throughout the United States. *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 1073–1079.
9. LEE B.W., BEY R.F., BAARSCH M.J. & EMERY D.A. (1993). Subtype specific ELISA for the detection of antibodies against influenza A H1N1 and H3N2 in swine. *J. Virol. Methods*, **45**, 121–136.
10. LEE B.W., BEY R.F., BAARSCH M.J. & SIMONSON R.R. (1993). ELISA method for detection of influenza A infection in swine. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **5**, 510–515.
11. LOEFFEN W.L., KAMP E.M., STOCKHOFE–ZURWIEDEN N., VAN NIEUWSTADT A.P., BONGERS J.H., HUNNEMAN W.A., ELBERS A.R., BAARS J., NELL T. & VAN ZIJDERVELD F.G. (1999). Survey of infectious agents involved in acute respiratory disease in finishing pigs. *Vet. Rec.*, **145**, 123–129.
12. NOBLE S., MCGREGGOR M.S., WENTWORTH D.E. & HINSHAW V.S. (1993). Antigenic and genetic conservation of the haemagglutinin in H1N1 swine influenza viruses. *J. Gen. Virol.*, **74**, 8243–8251.
13. SCHOLTISSEK C., BURGER H., BACHMANN P.A. & HANNOUN C. (1983). Genetic relatedness of hemagglutinins of the H1 subtype of influenza A viruses isolated from swine and birds. *Virology*, **129**, 521–523.
14. SENNE D.A. (1998). Virus propagation in embryonating eggs. *In: A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens*, Fourth Edition, Swayne D.E., Glisson J.R., Jackwood M.W., Pearson J.E. & Reed W.M., eds. American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, Pennsylvania, USA, 235–240.
15. SHEERAR M.G., EASTERDAY B.C. & HINSHAW V.S. (1989). Antigenic conservation of H1N1 swine influenza viruses. *J. Gen. Virol.*, **70**, 3297–3303.
16. SHOPE R.E. (1931). Swine influenza. III. Filtration experiments and etiology. *J. Exp. Med.*, **54**, 373–380.
17. SWENSON S.L., VINCENT L.L., LUTE B.M., JANKE B.H., LECHTENBERG K.E., LANDGRAF J.G., SCHMITT B.J., KINKER D.R. & McMILLEN J.K. (2001). A comparison of diagnostic assays for the detection of type A swine influenza virus from nasal swabs and lungs. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **13**, 36–42.
18. VAN REETH K., LABARQUE G., DE CLERCQ S. & PENZAERT M. (2001). Efficacy of vaccination of pigs with different H1N1 swine influenza viruses using a recent challenge strain and different parameters of protection. *Vaccine*, **19**, 4479–4486.
19. VINCENT L.L., JANKE B.H., PAUL P.S. & HALBUR P.G. (1997). A monoclonal–antibody–based immunohistochemical method for the detection of swine influenza virus in formalin–fixed, paraffin–embedded tissues. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **9**, 191–195.
20. WEBBY R.J., SWENSON S.L., KRAUSS S.L., GERRISH P.J., GOYAL S.M. & WEBSTER R.G. (2000). Evolution of swine H3N2 influenza viruses in the United States. *J. Virol.*, **74**, 8243–8251.

*

* *