

## ENFERMEDAD VESICULAR PORCINA

---

### RESUMEN

**Descripción e importancia de la enfermedad:** La enfermedad vesicular porcina (EVP) es una enfermedad contagiosa de los cerdos causada por un enterovirus y que se caracteriza por la aparición de vesículas en las bandas coronarias, en los talones de las pezuñas y, ocasionalmente, en los labios, la lengua, el hocico y los pezones. Cada cepa de la EVP tiene un grado distinto de virulencia, y la enfermedad puede ser subclínica, leve o grave, pudiéndose observar esta última sólo cuando los cerdos están alojados en locales con suelos abrasivos, en condiciones de humedad. La importancia crucial de la EVP es que puede resultar imposible de distinguir clínicamente de la fiebre aftosa (FA), y debe asumirse que los brotes de la enfermedad vesicular en cerdos corresponden a FA hasta que se investiguen mediante pruebas de laboratorio y se demuestre lo contrario. Sin embargo, en los últimos años la infección subclínica ha sido la forma más observada.

**Identificación del agente:** En los cerdos en los que se aprecie la enfermedad vesicular, la demostración del antígeno vírico de la EVP mediante el enzoinmunoanálisis (ELISA) en una muestra de material de una lesión o de líquido vesicular es suficiente para un diagnóstico positivo. Si la cantidad de material de una lesión enviada para el diagnóstico no es suficiente (menos de 0,5 gramos) o si los resultados de las pruebas son negativos o no concluyentes, se puede utilizar una prueba más sensible, como la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), o el aislamiento del virus (VI) en cultivos celulares porcinos. Si finalmente se produce un efecto citopático en alguno de los cultivos inoculados, la demostración del antígeno vírico de la EVP mediante la técnica ELISA o del ARN vírico por RT-PCR será suficiente para un diagnóstico positivo. La infección subclínica puede detectarse mediante un muestreo aleatorio de las heces procedentes del suelo de la pocilga mediante la identificación del virus de la EVP con una RT-PCR o con pruebas de identificación del virus (VI).

**Pruebas serológicas:** Las pruebas serológicas sirven de ayuda para la confirmación de casos clínicos y para la identificación de las infecciones subclínicas. Pueden identificarse anticuerpos específicos frente al virus de la EVP mediante ELISA, para el cribado, y mediante la prueba de microneutralización, para la confirmación. Una pequeña proporción (hasta el 0,1%) de los cerdos normales, no infectados, reaccionarán positivamente en las pruebas serológicas para la EVP. La reactividad de estos "animales positivos aislados" es transitoria, de modo que pueden diferenciarse de los cerdos infectados mediante un nuevo muestreo de los animales positivos y de sus cohortes.

En los laboratorios de referencia pueden adquirirse los reactivos y las sustancias estándar para el diagnóstico.

**Requisitos para las vacunas:** Actualmente no se dispone de vacunas comerciales contra la EVP.

### A. INTRODUCCIÓN

La enfermedad vesicular porcina (EVP) es una enfermedad subclínica, leve o grave, dependiendo de la cepa de virus implicada, de la vía y la dosis de infección y de las condiciones de cría en las que se mantiene a los cerdos. Clínicamente, la EVP puede no ser distinguible de la fiebre aftosa (FA) y, por lo tanto, resulta un requisito urgente el realizar un diagnóstico diferencial a nivel de laboratorio. No obstante, durante este siglo, los brotes de EVP se han caracterizado por la presencia de signos menos graves o por la ausencia de los mismos; se ha detectado la infección al analizar muestras para un programa de serovigilancia o para la certificación relacionada con la exportación.

Después de su primera detección en 1966, la enfermedad apareció en forma de epidemias en el este y el oeste de Europa (durante los años 1970 y 1980), y también se detectó en el este de Asia. Desde entonces, la EVP solo se ha notificado esporádicamente, principalmente en Italia, donde su circulación se investiga y controla a través de un plan de vigilancia virológica y serológica.

El período de incubación de la EVP dura entre 2 y 7 días, tras los cuales puede aparecer una fiebre pasajera de hasta 41°C. A continuación, aparecen las vesículas en la banda coronaria, normalmente en la unión con el talón. Estas vesículas pueden afectar a la banda coronaria completa, dando lugar a la pérdida de la pezuña. Con menos frecuencia, las vesículas pueden aparecer en el hocico, particularmente en la superficie dorsal, en los labios, la lengua y las ubres, y pueden observarse erosiones superficiales en las articulaciones. Los cerdos afectados pueden renquear y estar inapetentes durante unos cuantos días. El aborto no es una característica típica de la EVP. La recuperación completa se produce normalmente en 2–3 semanas (Loxam & Hedger, 1983). Los cerdos afectados pueden excretar el virus por la nariz, la boca y en las heces, hasta 48 horas antes de la aparición de los signos. La mayor parte de los virus se produce en los primeros 7 días después de la infección, y la excreción de virus por la boca y la nariz se detiene normalmente en menos de 2 semanas. El virus se puede seguir eliminando en las heces durante un periodo de hasta 3 meses, aunque en las circunstancias habituales, el virus es detectable en las heces solo durante un periodo máximo de 1 mes. El virus de la EVP es extraordinariamente resistente a la inactivación en el hábitat natural, y es estable en el intervalo de pH 2,5–12,0 (Mann, 1981), a diferencia del virus de la fiebre aftosa, que resulta muy lábil fuera del intervalo de pH 6,0–8,0.

Debido a que la EVP puede ser leve o subclínica, es imprescindible que se incluyan muestras de suero de los cerdos sospechosos y de otros animales aparentemente no afectados del grupo, cuando se envíen muestras procedentes de casos clínicamente sospechosos. El virus de la EVP puede pasar desapercibido hasta que afecta a un grupo particularmente susceptible y, por lo tanto, con el fin de establecer cuánto tiempo estará presente la enfermedad, es necesario comprobar la seroconversión frente al virus de la EVP en animales aparentemente sanos. Así mismo, la identificación del isotipo de las inmunoglobulinas (M o G) contra el virus de la EVP puede ser de ayuda para determinar el tiempo de exposición a la infección.

El virus de la EVP ha sido clasificado como una variante porcina de un coxsackievirus B5 humano (*Enterovirus B*) perteneciente a la familia *Picornaviridae*. Todas las cepas aisladas se clasifican en un único serotipo, con cuatro variantes antigénicas/genómicas diferenciables (Brocchi *et al.*, 1997), que evolucionaron secuencialmente en distintos periodos de tiempo sin solapamiento, excepto en el caso de las variantes tercera y cuarta, que estuvieron circulando simultáneamente en Italia durante los años 1992 y 1993. Todos los virus de la EVP que han surgido desde entonces divergen de un origen común y se agrupan en un único linaje antigénico/genómico correspondiente al grupo cuarto, el más reciente; no obstante, dentro del mismo pueden distinguirse dos sublinajes genómicos (Knowles *et al.*, 2007). Antigénicamente y genéticamente, el virus de la EVP está estrechamente relacionado con el virus humano coxsackievirus B5, y se ha sugerido que surge de la recombinación con otro enterovirus humano, el coxsackievirus A9 (Bruhn *et al.*, 2015). En 1975, en Rusia se describió una segunda adaptación de un enterovirus humano a causar enfermedad vesicular en cerdos, y se relacionó con coxsackievirus B4, que serológicamente está bien diferenciado del virus de la EVP y de CV-B5 (Lomakina *et al.*, 2016).

Hay informes de la seroconversión frente al virus de la EVP en personal de laboratorio que está en contacto con el agente. Sin embargo, la enfermedad clínica descrita en humanos es leve, con excepción de un único caso de meningitis asociada a la infección por el virus de la EVP. Sin embargo, no se han descrito casos de seroconversión o de la enfermedad en ganaderos ni veterinarios en contacto con cerdos infectados. No se ha podido demostrar la transmisión de coxsackievirus B5 entre los cerdos en condiciones experimentales. Las manipulaciones realizadas en el laboratorio deben llevarse a cabo a un nivel de bioseguridad y biocontención adecuado, que se determinará mediante análisis del riesgo biológico (véase el Capítulo 1.1.4 *Bioseguridad y bioprotección: norma para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones de los animales*).

## B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

**Tabla 1.** Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la enfermedad vesicular porcina y sus finalidades

Método	Propósito					
	Determinar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección - vigilancia	Determinar el estado inmunitario de un animal o una población post-vacunación
<b>Identificación del agente</b>						
<b>Aislamiento del virus</b>	–	+	+	+++	–	n/a
<b>RT-PCR</b>	–	+++	+++	+++	–	n/a
<b>ELISA para detección de antígeno</b>	–	–	–	+++	–	n/a
<b>Detección de respuesta inmunitaria</b>						
<b>Neutralización del virus</b>	+	+++	+	+	+	n/a
<b>ELISA de competición para el cribado de anticuerpos</b>	+++	+++	+++	+	+++	n/a
<b>ELISA para identificación de IgG e IgM</b>	+	+++	+++	+	+	n/a

Clave: +++ = método recomendado, validado para el fin indicado; ++ = método adecuado, pero puede precisar una validación posterior; + = puede utilizarse en ciertas situaciones, pero el coste, la fiabilidad u otros factores limitan mucho su aplicación; – = no adecuado para esta finalidad; n/a = no aplicable.

RT-PCR = reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa; ELISA = enzimoimmunoanálisis.

NOTA: Para escoger las pruebas adecuadas, se deben tener en cuenta las diversas cinéticas de las dianas de diagnóstico (agente y anticuerpos) durante la infección.

### 1. Identificación del agente

Cualquier afección vesicular de los cerdos podría constituir una infección por el virus de la fiebre aftosa y, por lo tanto, es necesario llevar a cabo un diagnóstico diferencial entre la fiebre aftosa y otros trastornos vesiculares, como la enfermedad vesicular porcina. El diagnóstico de la EVP requiere la utilización de las instalaciones de un laboratorio especializado para el diagnóstico de la EVP. Los países que carezcan de dichas instalaciones habrán de enviar las muestras para ser investigadas al Laboratorio de Referencia de la OIE para la EVP (en la Tabla de la Parte 4 de este *Manual Terrestre* o la página web de la OIE <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/> se indica la lista más actualizada).

En los casos clínicos, la detección de los antígenos o el genoma del virus de la EVP por medio de un enzimoimmunoanálisis (ELISA) y por la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) tienen el mismo valor diagnóstico que el aislamiento del virus. Por su rapidez, el ELISA y la RT-PCR constituyen pruebas analíticas adecuadas. Sin embargo, el aislamiento del virus constituye el método de referencia y debe utilizarse en el caso de que un resultado positivo mediante ELISA o RT-PCR no se asocie con la detección de signos de la enfermedad, con la detección de cerdos seropositivos, o con una conexión epidemiológica directa con un brote confirmado.

Si hay signos, la investigación comenzará con el examen de una suspensión al 10% de material de las lesiones en solución salina tamponada con fosfato (PBS) o medio de cultivo tisular y antibióticos. Las muestras fecales se utilizan para la detección del virus cuando se sospeche la presencia de una infección subclínica. Pueden recogerse de los cerdos o del suelo de las instalaciones en las que se sospeche que alberguen o hayan

albergado cerdos infectados con EVP. Normalmente el nivel de virus de las heces es insuficiente para la detección mediante el ELISA y se requiere la utilización de la RT-PCR y/o aislamiento del virus. La inoculación de una proporción significativa de muestras fecales en los cultivos celulares propiciará el crecimiento de otros enterovirus. Estos últimos pueden diferenciarse del virus de la EVP mediante el ELISA o la RT-PCR, pero pueden crecer en cantidad superior al virus de la EVP, que también está presente, y de este modo dar lugar a falsos negativos. Por lo tanto, la RT-PCR es más sensible que el aislamiento del virus cuando se aplica a muestras fecales.

## 1.1. Preparación de las muestras

### 1.1.1. Material procedente de lesiones

Las muestras se deben transportar en solución salina tamponada con fosfato (PBS) con antibióticos, mezclada con glicerol (1/1) y a un pH de 7,2–7,6. Se prepara una suspensión triturando la muestra con arena esterilizada en un mortero esterilizado con un pequeño volumen de PBS o medio de cultivo celular y antibióticos. Se debe añadir más medio de cultivo hasta obtener una suspensión de en torno al 10%. Esta se clarifica mediante un centrifugado a 2.000 *g* durante 20–30 minutos y se recoge el sobrenadante.

### 1.1.2. Muestras fecales

Se resuspende el material fecal (aproximadamente 20 g) en una cantidad mínima de medio de cultivo celular de tejido o en tampón fosfato (tampón fosfato 0,04 M o PBS). Se homogeneiza la suspensión en un vórtex y se clarifica mediante una centrifugación a 2.000 *g* durante 20–30 minutos; se recoge el sobrenadante y se filtra con un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$ .

## 1.2. Aislamiento del virus

Se inocular una porción de la suspensión epitelial en monocapas de células IB-RS-2 u otras líneas celulares porcinas susceptibles, cultivadas en recipientes adecuados (frascos de 25  $\text{cm}^2$ , tubos rodantes o placas de 24, 12 o 6 pocillos). Para el diagnóstico diferencial (por ejemplo, la fiebre aftosa) se emplearán en paralelo sistemas de cultivos celulares bovinos. Por lo general, el virus de la EVP crece solamente en células de origen porcino. Para el crecimiento celular, se añade suero bovino al 10%; para el mantenimiento, se añade suero bovino al 3% y antibióticos.

Los cultivos se examinan a diario. Si se observa el efecto citopático, se recoge el líquido sobrenadante y se realiza la identificación del virus mediante un ELISA (u otra prueba adecuada, como la RT-PCR). En los cultivos negativos no se aprecia ningún efecto después de 48 o 72 horas, aunque se mantienen en observación durante 2–3 días más. Si no se produce el efecto citopático tras el segundo pase, la muestra se etiqueta como “NVD” (sin detección de virus). Cuando se aísla el virus en las heces, donde la cantidad de virus presente puede ser pequeña, puede ser necesario un tercer pase del cultivo celular.

## 1.3. Métodos inmunológicos

### 1.3.1. Enzimoimmunoanálisis

Para la detección del antígeno vírico de la EVP se ha preferido utilizar un ELISA indirecto de tipo “sándwich” en lugar de la prueba de fijación del complemento. La prueba tiene el mismo formato que la que se utiliza para el diagnóstico de la FA. Se recubren los pocillos de las placas ELISA con antisuero de conejo contra el virus de la EVP. Este es el suero de captura. Se añaden las suspensiones de los sueros problema y se incuban. Se incluyen también los controles apropiados. En la siguiente fase se añade el suero detector de cobaya, seguido de la adición del suero anti-cobaya de conejo conjugado con peroxidasa de rábano. Se hace un lavado exhaustivo entre etapas para eliminar los reactivos que no se hayan unido. La reacción positiva se pone de manifiesto si se produce una reacción de color al añadir un cromógeno (por ejemplo, ortofenilendiamina) y un sustrato ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). En el caso de las reacciones fuertemente positivas el resultado será evidente a simple vista, pero los resultados se pueden leer también por espectrofotometría a la longitud de onda adecuada, en cuyo caso una lectura de absorbancia de  $\geq 0,1$  por encima del nivel de fondo indica una reacción positiva. Como alternativa a los antisueros de cobaya y de conejo, se pueden emplear también anticuerpos monoclonales apropiados (MAb), adheridos a la placa ELISA y utilizados como anticuerpo de captura conjugado con peroxidasa como anticuerpo detector. Por ejemplo, un ELISA sándwich simple en el que se utilice MAb 5B7 como anticuerpo de captura o bien como anticuerpo conjugado/detector, que representa también el método de referencia para el ELISA de competición serológico, es adecuado para detectar el antígeno del virus de la EVP.

Para estudiar la variación antigénica entre las cepas del virus de la EVP, se puede utilizar también un ELISA basado en MAb. Las cepas víricas obtenidas en los cultivos celulares son capturadas por un antisuero de conejo hiperinmune frente al virus de la EVP adherido a la fase sólida. Después se hacen reaccionar con un grupo de MAb apropiados, y la unión de los MAb a las cepas de campo se compara con la unión a las cepas originales. Una unión fuerte indica la presencia de epítomos compartidos por la cepa original y las cepas de campo (Brocchi *et al.*, 1997).

#### 1.4. Métodos de reconocimiento de los ácidos nucleicos

##### 1.4.1. Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa

La transcripción inversa seguida de la PCR (RT-PCR) es un método útil para detectar el genoma del virus de la EVP en varias muestras de casos clínicos y subclínicos. Se han descrito varios métodos (Benedetti *et al.*, 2010; Callens & De Clercq, 1999; Fallacara *et al.*, 2000; Hakhverdyan *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 1997; McMenamy *et al.*, 2011; Nunez *et al.*, 1998; Reid *et al.*, 2004a; 2004b; Vangrysperre & De Clercq, 1996), en los que se emplean diferentes técnicas para la extracción de ARN, orientados a diferentes partes del genoma del virus de la EVP, y se emplean diferentes enfoques para la detección de los productos de amplificación de ADN. Sin embargo, en un estudio comparativo sobre muestras fecales positivas de muchos brotes de EVP diferentes, la RT-PCR de un solo paso (Benedetti *et al.*, 2010) mostró el mejor rendimiento diagnóstico, con la capacidad de revelar todos los sublinajes genómicos circulantes, en comparación con dos RT-PCR en tiempo real dirigidas a la región 5' no traducida (Reid *et al.*, 2004a, 2004b), y con una prueba de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) RT (Blomström *et al.*, 2008).

El método indicado abajo describe un protocolo de inmunoestracción de ARN y protocolo de RT-PCR de un solo paso dirigida a la región 3D del virus de la EVP, que codifica la ARN polimerasa.

Para aislar ARN, se ha observado que la técnica de la inmunocaptura con un MAb específico del virus de la EVP es especialmente eficaz en el caso de las muestras fecales (Fallacara *et al.*, 2000); permite el enriquecimiento y la purificación del VEV, que normalmente está presente a bajas concentraciones en las heces, con una eliminación eficiente de los posibles inhibidores de la reacción.

Este método es adecuado para laboratorios que no cuentan con un equipo sofisticado para la detección en tiempo real de los productos de amplificación de ADN; pero, en los que cuentan con ese equipo, un enfoque como el descrito por Reid *et al.* (2004a; 2004b) ofrece ventajas en términos de la facilidad de uso y de un menor riesgo de contaminación del laboratorio por los productos de la PCR.

##### 1.4.2. Inmunoestracción de ARN

- i) Inmunoestracción de ARN: Se recubren pocillos de una placa de ELISA con una solución saturada de MAb 5B7 (200 µl/pocillo, diluida en tampón carbonato-bicarbonato) mediante incubación a 4°C durante toda una noche. Se lavan las placas tres veces con PBS. Se utilizan las placas de forma inmediata o se guardan a -20°C durante un máximo de 2–3 semanas, o más si se han estabilizado.
- ii) Se distribuye cada muestra (suspensión de heces) en tres pocillos de la placa recubierta de 5B7 (200 µl/pocillo, 600 µl de muestra en total).
- iii) Después de incubar durante 1 hora a 37°C agitando con mucha suavidad, se lavan los pocillos tres veces con PBS. El lavado se realiza a mano, para evitar la contaminación cruzada de los pocillos.
- iv) Se extrae ARN de cada muestra mediante la adición de aproximadamente 100 µl/pocillo de tampón de lisis (tiocianato de guanidina 4 M, citrato sódico 25 mM, pH 7, sarkosyl al 0,5%). Se incuban los pocillos durante 3–5 minutos, se recupera la muestra de los tres pocillos (300–350 µl en total) y se transfiere a un único tubo.
- v) Se precipita el ARN añadiendo un mezcla de 750 µl de etanol absoluto y 35 µl de acetato sódico 3 M (pH 5,2); los viales se agitan con un vórtex y se incuban a -20°C durante un mínimo de 1 hora (también puede ser conveniente una precipitación durante toda la noche a -20°C).

- vi) Se centrifuga la muestra a 15.500–16.000 **g** durante 30 minutos a 4°C, tras lo cual debería ser visible un precipitado que debe lavarse con 500 µl de etanol frío al 70% (centrifugado a 15.500–16.000 **g** durante 10 minutos a 4°C) y secarse.
- vii) Se vuelve a suspender el precipitado de ARN en 20 µl de agua DEPC o de agua comercial sin ARNasa.

NOTA: como alternativa a la inmunocaptura, la extracción de ARN puede realizarse empleando un kit comercial adecuado basado en la lisis mediante sales caotrópicas y la afinidad del ARN al sílice.

#### 1.4.2.1. RT-PCR de un solo paso

Es posible que el siguiente protocolo de RT-PCR convencional deba ajustarse para adaptarlo a los reactivos concretos utilizados.

- i) Se prepara la mezcla de reacción (20 µl es el volumen final por cada muestra problema)

Agua sin ARNasa	10,75 µl
Tampón para RT-PCR 5x	5 µl
Mezcla de dNTP (cada dNTP a 10 mM)	1 µl
Cebador directo pSVDV-SS4 10 pmol/ul*	1µl
Cebador inverso pSVDV-SA2 10 pmol/ul*	1 µl
Inhibidor de la ARNasa	0,25 µl (equivalente a 5 U)
Mezcla enzimática para la RT-PCR	1 µl

\*Secuencia de cebadores: pSVDV-SS4 5'-TTC-AGA-ATG-ATT-GCA-TAT-GGG-G-3'  
pSVDV-SA2 5'-TCA-CGT-TTG-TCC-AGG-TTA-CY-3'

- ii) Se añaden 5 µl de cada ARN molde a 20 µl de mezcla de reacción.
- iii) Se ejecuta el siguiente programa en un termociclador:
  - Un ciclo a 50°C durante 30 minutos (paso de transcripción inversa)
  - Un ciclo a 95°C durante 15 minutos (paso de activación inicial)
  - 40 ciclos de 94°C durante 20 segundos (desnaturalización), 60°C durante 20 segundos (hibridación), 72°C durante 45 segundos (extensión)
  - Un ciclo a 72°C durante 10 minutos (extensión final).
- iv) Se mezcla una alícuota de 20 µl de cada muestra con 4 µl de solución de tinción y se carga en un gel de agarosa al 2% que contenga un colorante intercalante de ADN apropiado. Tras la electroforesis, un resultado positivo será la presencia de un fragmento de 154 pb de la región que codifica la ARN polimerasa (3D) del virus de la EVP en el gel. Como alternativa, el gel puede teñirse tras la electroforesis para reducir la contaminación del equipo mediante el empapado en una solución de tinción.

#### 1.4.2.2 RT-PCR en tiempo real

Esta prueba también se puede adaptar al formato de la RT-PCR en tiempo real con reactivos/kit específicos, en presencia de una tinción para ADN adecuada y empleando el siguiente programa en un ciclador de PCR en tiempo real:

- i) 1 ciclo de 50°C durante 30 minutos (paso de transcripción inversa)
- ii) 1 ciclo de 95°C durante 15 minutos (paso de activación inicial)
- iii) 40 ciclos, cada uno consistirá en 94°C durante 15 segundos (desnaturalización), 58°C durante 30 segundos (hibridación), 72°C durante 30 segundos (extensión) y 77°C durante 15 segundos (detección).

Para el ciclo de derretido:

- iv) 1 ciclo de 72°C durante 1 minuto y aumento de la temperatura de 72°C a 95°C, mediante aumentos graduales de 0,5°C durante 5 segundos cada uno. Los productos de la amplificación específicos del VEVP generan curvas de derretido con un pico dentro del intervalo de temperaturas de 79,5–82,5°C.

### 1.4.3. Análisis de la secuencia

El análisis comparativo de las secuencias del genoma vírico es útil para establecer las relaciones entre las cepas aisladas del virus de la EVP. La secuenciación del gen *1D*, que codifica la principal proteína estructural VP1, o de la región 3D, ha permitido agrupar las cepas del virus de la EVP en función de la homología de sus secuencias, y relacionar epidemiológicamente las cepas causantes de la enfermedad en distintas localizaciones o en épocas diferentes (Brocchi *et al.*, 1997). Se conservan las bases de datos de las secuencias de los genes *1D* y *3D* de los virus de la EVP en el Laboratorio de Referencia de la OIE de Pirbright, Reino Unido, y en el Laboratorio de Referencia de la OIE de Brescia, Italia, respectivamente. En la *International Nucleotide Sequence Database Collaboration* (que incluye GenBank, ENA, y DDBJ) se pueden adquirir otras secuencias (incluidas las de los genomas completos de los VEVP).

## 2. Pruebas serológicas

Estas pruebas se utilizan para la confirmación de los brotes por los laboratorios, para la vigilancia serológica y para la certificación relacionada con la exportación de cerdos. Normalmente la EVP se diagnostica solo con los resultados aportados por las pruebas serológicas. Debido a la naturaleza subclínica o leve de la enfermedad, la primera sospecha de la enfermedad se tiene con frecuencia después de las pruebas serológicas rutinarias que se realizan para la vigilancia de la enfermedad o para el certificado de exportación. Para la detección de anticuerpos contra el virus de la EVP se han descrito la prueba de neutralización vírica (NV), la de inmunodifusión doble, la de inmunodifusión radial, la de contra-inmunolectroforesis y el ELISA (Brocchi *et al.*, 1995; Donaldson *et al.*, 1983; Golding *et al.*, 1976). Sin embargo, las pruebas de NV y el ELISA son las únicas pruebas de uso común. La prueba de NV es la prueba confirmativa aceptada, pero tiene la desventaja de que lleva 2–3 días completarla, y requiere instalaciones para el cultivo celular y la manipulación de virus vivo en unas instalaciones y mediante unos procedimientos que cuenten con la bioseguridad y la bioprotección adecuadas, que vendrán determinadas por un análisis del riesgo biológico (véase el capítulo 1.1.4). El ELISA es más rápido y sencillo. Una pequeña proporción de los sueros procedentes de los animales que no han estado previamente expuestos al virus de la EVP podrían reaccionar positivamente en pruebas serológicas de detección de anticuerpos contra el virus de la EVP. El ELISA de competición que emplea el MAb 5B7 (MAC-ELISA) es una técnica fiable para la detección de anticuerpos de la EVP (Brocchi *et al.*, 1995; Heckert *et al.*, 1998) y se han obtenido resultados similares con otras pruebas ELISA (Chenard *et al.*, 1998; Ko *et al.*, 2005). Los resultados con una pequeña proporción (0,25%–0,45%) de sueros de cerdos normales son dudosos o positivos mediante el MAC-ELISA, y deben probarse de nuevo mediante la prueba de NV. Hasta aproximadamente el 50% de estos sueros también resultarán positivos en la prueba de NV, es decir, entre el 0,1 y el 0,2% de la población original). Se pueden considerar como no infectados a los animales que den positivo mediante el ELISA pero negativo en la prueba de NV. Deben recogerse muestras repetidas de los animales que den positivo en ambas pruebas y también de sus cohortes. Una titulación constante o decreciente del título en el animal positivo y la ausencia de anticuerpos contra el virus de la EVP en las cohortes confirma el estado del animal positivo como un “positivo aislado”. Se desconocen los factores responsables de la aparición de los “animales positivos aislados”. La reactividad serológica cruzada con el virus de la EVP podría darse debido a la infección por otro picornavirus, aunque aún sin identificar, o puede deberse a factores inespecíficos presentes en el suero. Puede resultar útil la identificación del isotipo del anticuerpo que se halla en los sueros positivos (Brocchi *et al.*, 1995), puesto que los sueros de los “animales positivos aislados” contienen, exclusivamente, IgM y no se convierten en IgG (De Clercq, 1998). Las pruebas ELISA específicas para el isotipo IgM/IgG también son de ayuda para determinar el momento de infección del cerdo o de las instalaciones infectadas. La presencia de IgM, solo o junto con IgG, es prueba de una infección reciente y de la propagación del virus, mientras que la detección de solo IgG indicaría una exposición más antigua a la infección (Brocchi *et al.*, 1995).

### 2.1. Neutralización vírica

La microprueba cuantitativa de NV para la detección de anticuerpos frente al virus de la EVP se lleva a cabo utilizando células IB-RS-2 (o células adecuadas de cerdo susceptible) en placas de microtitulación de fondo plano para cultivos de tejidos.

Se hace crecer el virus en monocapas de células IB-RS-2 y, después de añadir un volumen igual de glicerol, se guarda a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se ha observado que el virus de la EVP es estable en estas condiciones durante al menos 1 año. Antes de analizar los sueros, se inactivan sometiéndolos a  $56^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos. Un medio adecuado para el cultivo es el medio completo de Eagle/LYH con antibióticos.

Esta es una prueba de volúmenes iguales en la que se utilizan volúmenes de 50  $\mu\text{l}$ .

- i) A partir de una dilución 1/4, se hacen diluciones seriadas con un factor de dilución 2 de los sueros en las placas, empleando dos hileras de pocillos para cada uno de los sueros problema y un volumen de 50  $\mu\text{l}$ .

- ii) Se añade el virus previamente titulado. Cada volumen de 50 µl de suspensión vírica contiene alrededor de 100 DICC<sub>50</sub> (dosis que resulta infectiva en el 50% de los cultivos celulares expuestos).
- iii) Se incluyen los siguientes controles: al menos un suero débilmente positivo y un suero negativo, un control celular, un control de medio de cultivo y una titulación del virus utilizada para calcular el título vírico real empleado en la prueba.
- iv) Se cubren las placas y se incuban a 37°C durante 1 hora.
- v) Se prepara una suspensión celular de 10<sup>6</sup> células/ml en medio con suero bovino al 10%, a fin de favorecer el crecimiento celular. Se añaden 50 µl de esta suspensión celular a cada pocillo.
- vi) Se sellan las placas con una cinta sensible a la presión y se incuban a 37°C durante 2–3 días. Alternativamente, las placas pueden taparse con cubiertas no herméticas e incubarse a 37°C en una atmósfera con dióxido de carbono al 5% durante 2–3 días.
- vii) Al cabo de 48–72 horas, se realizan las lecturas al microscopio. Finalmente se pueden fijar las placas y se tiñen al tercer día. La fijación se realiza con formalina/solución salina al 10% durante 30 minutos. La tinción se realiza sumergiendo las placas durante 30 minutos en azul de metileno al 0,05% preparado en formalina al 10%. Las placas se enjuagan con agua de grifo. Las lecturas positivas son capas celulares teñidas de azul (donde el virus ha sido neutralizado y las células permanecen intactas), mientras que los pocillos vacíos (donde el virus no ha sido neutralizado) se consideran negativos.

viii) Interpretación de los resultados

La prueba se considera válida cuando la cantidad de virus realmente utilizada por pocillo es de entre 10<sup>1,5</sup> y 10<sup>2,5</sup> DICC<sub>50</sub>, y el título de los sueros estándar positivos es como máximo el doble del esperado. Los títulos se expresan como la dilución final del suero presente en la mezcla de suero/virus donde el 50% de los pocillos está protegido. Los laboratorios deberán establecer sus propios títulos de corte tomando como referencia tanto los resultados de una población negativa como los reactivos estándar disponibles en los Laboratorios de Referencia de la OIE, en concreto, el suero débilmente positivo que define el nivel más bajo de anticuerpos que los Laboratorios deberán valorar siempre como positivo.

## 2.2. Enzoinmunoanálisis

Existen a la venta kits para la detección de anticuerpos en muestras porcinas. En el ELISA desarrollado por Brocchi *et al.* (1995), el antígeno vírico de la EVP es capturado en la fase sólida utilizando el MAb 5B7. A continuación se evalúa la capacidad de los sueros problema para inhibir la unión del anticuerpo MAb 5B7 conjugado con peroxidasa al antígeno capturado. Finalmente se detecta la cantidad del MAb conjugado unido, mediante la adición de sustrato y cromógeno.

- i) Se revisten las placas ELISA con 50 µl/pocillo de MAb 5B7 a una dilución saturada, en tampón carbonato/bicarbonato, pH 9,6, y se incuban a 4°C durante toda la noche.
- ii) Se lavan las placas tres veces con PBS más Tween 20 al 0,05%, y se añaden 50 µl de antígeno de la EVP (el virus de la EVP se ha hecho crecer en células IB-RS-2, se ha clarificado, filtrado e inactivado mediante BEI) a una dilución óptima predeterminada. La dilución óptima del antígeno se determina mediante las titulaciones de doble entrada del antígeno y del MAb conjugado que definen la dilución de trabajo, presentando un valor de absorbancia situado en la parte superior de la región lineal de la curva de titulación del antígeno (entre 1,5 y 2,0 unidades de densidad óptica). A continuación se incuban las placas a 37°C durante 1 hora.
- iii) Después de tres lavados adicionales, se incuban 50 µl de los sueros problema diluidos (la inactivación es irrelevante) y de los sueros control con el antígeno capturado a 37°C durante 1 hora. Los sueros se pueden analizar a una sola dilución (1/7,5) o titularse. En el segundo caso, se obtienen diluciones de los sueros a un tercio directamente en los pocillos de las placas ELISA añadiendo 10 µl de suero a 65 µl de tampón (dilución 1/7,5) transfiriendo a continuación 25 µl a los pocillos consecutivos, que contienen 50 µl de tampón mezclando y desechando finalmente 25 µl. Para pruebas realizadas con muy pocas muestras, la dilución de cribado de 1/7,5 se obtiene añadiendo 7 µl de cada suero problema (y sueros control) a 45 µl de tampón previamente distribuido en los pocillos.
- iv) Después de 1 hora de incubación, se añaden 25 µl de una dilución óptima de MAb 5B7 conjugado con peroxidasa (véase la etapa (ii)) a cada pocillo, y se incuban las placas a 37°C, durante 1 hora más.



- v) Después de una serie final de lavados, se inicia la reacción colorimétrica mediante la distribución de 50 µl por pocillo de la solución sustrato (por ejemplo 0,5 mg/ml de ortofenilendiamina en tampón fosfato/citrato, pH 5, que contenga H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,02%).
- vi) Transcurridos 10 minutos, se detiene la reacción añadiendo 50 µl de ácido sulfúrico 2 N. Se lee la absorbancia a una longitud de onda apropiada de 492 nm utilizando un lector de microplacas.
- El antígeno, los sueros y el conjugado se diluyen en PBS (pH 7,4) que contenga Tween 20 al 0,05% y extracto de levadura al 1%; el tampón de dilución para los sueros contiene, además, suero de ratón al 1,0% (o como alternativa otra fuente de inmunoglobulinas murinas) para impedir la unión inespecífica del suero de cerdo al MAb 5B7, ya se encuentre recubriendo la placa o conjugado con peroxidasa.
- vii) *Controles*: Cuatro pocillos de cada placa con todos los reactivos, excepto el suero problema, para confirmar la lectura de máxima absorbancia para el antígeno; el suero de un cerdo negativo y un suero estándar de cerdo débilmente positivo; opcionalmente, el suero de un cerdo fuertemente positivo a cuatro diluciones, previamente calibradas para dar una inhibición ≥50% (véase el paso viii abajo) a la dilución más alta.
- viii) Interpretación de los resultados: Las reacciones se expresan como el porcentaje de inhibición de la reacción del MAb con el antígeno de la EVP, causado por cada suero problema. Se considera que los sueros son positivos cuando se produce una inhibición ≥80% en la dilución 1/7,5; los sueros son negativos cuando se produce una inhibición <70% en la dilución 1/7,5; son dudosos cuando se produce una inhibición ≥70% y <80% en la dilución 1/7,5. La segunda dilución (1/22,5) es indicadora del nivel de anticuerpos: los sueros fuertemente positivos muestran una inhibición >80% en las diluciones 1/7,5 y 1/22,5, mientras que los sueros con inhibición >80% en la dilución 1/7,5, pero con menos del 50% de inhibición en la dilución 1/22,5 se consideran débilmente positivos o dudosos. Deberán confirmarse todos los sueros positivos y dudosos utilizando la prueba de NV.

## SUEROS DE REFERENCIA ESTÁNDAR PARA LAS PRUEBAS SEROLÓGICAS DE LA EVP

El Laboratorio de Referencia de la OIE en Pirbright, Reino Unido, mantiene una serie de sueros de referencia que han sido exhaustivamente validados por los Laboratorios de Referencia nacionales de la EVP de los estados miembros de la Unión Europea. Este conjunto de sueros incluye el suero débilmente positivo que define el nivel más bajo de anticuerpos que debe dar siempre un resultado positivo en el ELISA y en la prueba de la neutralización vírica (RS01-04-94 o equivalente). Se dispone de sueros positivos equivalentes a estos estándares de referencia y de Mab 5B7 en el Laboratorio de Referencia de la OIE, situado en Brescia, Italia.

## C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

Actualmente no se dispone de vacunas comerciales para la EVP.

## BIBLIOGRAFÍA

BENEDETTI D., PEZZONI G., GRAZIOLI S., BARBIERI I. & BROCCHI E. (2010). Comparative performance of three genome amplification assays for detection of swine vesicular disease virus in experimental and field samples. *In*: Proceedings of the First Congress of the European Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians (EAVLD), Lelystad, The Netherlands, 15–17 September 2010, O-2-09.

BLOMSTRÖM A., HAKVERD M., REID S.M., DUKES J.P., KING D.P., BELÁK S. & BERG M. (2008). A one step reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification assay for simple and rapid detection of swine vesicular disease virus. *J. Virol. Methods*, **147**, 188–193.

BROCCHI E., BERLINZANI A., GAMBA D. & DE SIMONE F. (1995). Development of two novel monoclonal antibody-based ELISAs for the detection of antibodies and the identification of swine isotypes against swine vesicular disease virus. *J. Virol. Methods*, **52**, 155–167.

BROCCHI E., ZHANG G., KNOWLES N.J., WILSDEN G., MCCAWLEY J.W., MARQUARDT O., OHLINGER V.F. & DE SIMONE F. (1997). Molecular epidemiology of recent outbreaks of swine vesicular disease: two genetically and antigenically distinct variants in Europe, 1987–1994. *Epidemiol. Infect.*, **118**, 51–61.

- BRUHN C.A., NIELSEN S.C., SAMANIEGO J.A., WADSWORTH J., KNOWLES N.J. & GILBERT M.T. (2015). Viral meningitis epidemics and a single, recent, recombinant and anthroponotic origin of swine vesicular disease virus. *Evol. Med. Public Health*, **2015**, 289–303.
- CELLENS M. & DE CLERCQ K. (1999). Highly sensitive detection of swine vesicular disease virus based on a single tube RT-PCR system and DIG-ELISA detection. *J. Virol. Methods*, **77**, 87–99.
- CHENARD G., BLOEMRAAD M., KRAMPS J.A., TERPSTRA C. & DEKKER A. (1998). Validation of a monoclonal antibody-based ELISA to detect antibodies directed against swine vesicular disease virus. *J. Virol. Methods*, **75**, 105–112.
- DONALDSON A.I., FERRIS N.P., KNOWLES N.J. & BARNETT I.T.R. (1983). Comparative studies of United Kingdom isolates of swine vesicular disease virus. *Res. Vet. Sci.*, **35**, 295–300.
- DE CLERCQ K. (1998). Reduction of singleton reactors against swine vesicular disease virus by a combination of virus neutralisation test, monoclonal antibody-based competitive ELISA and isotype specific ELISA. *J. Virol. Methods*, **70**, 7–18.
- FALLACARA F., PACCIARINI M., BUGNETTI M., BERLINZANI A. & BROCCHI E (2000). Detection of swine vesicular disease virus in faeces samples by immune-PCR assay. *In: Veterinary Virology in the New Millennium, Proceedings of the 5<sup>th</sup> International Congress of the European Society for Veterinary Virology, Brescia, Italy, 27–30 August 2000*, pp 173–174.
- GOLDING S.M., HEDGER R.S., TALBOT P. & WATSON J. (1976). Radial immunodiffusion and serum neutralisation techniques for the assay of antibodies to swine vesicular disease. *Res. Vet. Sci.*, **20**, 142–147.
- HAKHVERDYAN M., RASMUSSEN T.B., THOREN P., UTTENTHAL A. & BELAK S. (2006). Development of a real-time PCR assay based on primer-probe energy transfer for the detection of swine vesicular disease virus. *Arch. Virol.*, **151**, 2365–2376.
- HECKERT A., BROCCHI E., BERLINZANI A. & MACKAY D. (1998). An international comparative analysis of a competitive ELISA for the detection of antibodies to swine vesicular disease virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **10**, 295–297. KITCHING R.P. & DONALDSON A.I. (1987). Collection and transportation of specimens for vesicular virus investigation. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **6**, 263–272.
- KNOWLES N.J., WILSDEN G., REID S.M., FERRIS N.P., KING D.P., PATON D.J., FEVEIREIRO M. & BROCCHI E. (2007). Reappearance of swine vesicular disease virus in Portugal. *Vet. Rec.*, **161**, 71.
- KO Y.-J., CHOI K.-S., NAH J.-J., PATON D.J., OEM J.-K., WILSDEN G., KANG S.-Y., JO N.-I., KIM J.-H., LEE H.-W. & PARK J.-M. (2005). Noninfectious virus-like particle antigen for detection of swine vesicular disease virus antibodies in pigs by enzyme linked immunosorbent assay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **12**, 922–929.
- LIN F., MACKAY D.K.J. & KNOWLES N.J. (1997). Detection of swine vesicular disease virus RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods*, **65**, 111–121.
- LOXAM J.R. & HEDGER R.S. (1983). Swine vesicular disease: clinical signs, diagnosis, epidemiology and control. *Rec. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **2**, 11–24.
- LOMAKINA N.F., YU SHUSTOVA E., STRIZHAKOVA O.M., FELIX DREXLER J. & LUKASHEV A.N. (2016). Epizootic of vesicular disease in pigs caused by coxsackievirus B4 in the Soviet Union in 1975. *J. Gen. Virol.*, **97**, 49–52.
- MANN J.A. (1981). Swine vesicular disease. *In: Virus Diseases of Farm Animals, Vol. 2*, Gibbs E.P.J., ed. Academic Press, London, UK, 365–381.
- MCMENAMY M.J., MCKILLEN J., REID S.M., HJERTNER B., KING D.P., ADAIR B. & ALLAN G. (2011). Development of a minor groove binder assay for real-time one-step RT-PCR detection of swine vesicular disease virus. *J. Virol. Methods*, **171**, 219–224.
- NUNEZ J.I., BLANCO E., HERNANDEZ T., GOMEX-TEJEDOR C., MARTIN M.I., DOPAZO J. & SOBRINO F. (1998). A RT-PCR assay for the differential diagnosis of vesicular viral diseases of swine. *J. Virol. Methods*, **72**, 227–235.
- REID S.M., FERRIS N.P., HUTCHINGS G.H., KING D.P. & ALEXANDERSEN S. (2004a). Evaluation of real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays for the detection of swine vesicular disease virus. *J. Virol. Methods*, **116**, 169–176.

REID S.M., PATON D.J., WILSDEN G., HUTCHINGS G.H., KING D.P., FERRIS N.P. & ALEXANDERSEN S. (2004b). Use of automated real-time RT-PCR to monitor experimental swine vesicular disease virus infection in pigs. *J Comp. Pathol.*, **131**, 308–317.

VANGRYSPERRE W. & DE CLERCQ K. (1996). Rapid and sensitive polymerase chain reaction based on detection and typing of foot-and-mouth disease virus in clinical samples and cell culture isolates, combined with a simultaneous differentiation with other genomically and/or symptomatically related viruses. *Arch. Virol.*, **141**, 331–344.

\*

\* \*

**NB:** Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para la Enfermedad vesicular porcina (puede consultarse la lista más actualizada en la Tabla de la Parte 4 de este *Manual Terrestre* o en la página web de la OIE: <http://www.oie.int/es/nuestra-experiencia-cientifica/laboratorios-de-referencia/lista-des-laboratorios/>).

Para más información sobre pruebas de diagnóstico y reactivos para la Enfermedad vesicular porcina, por favor contacte con los Laboratorios de Referencia de la OIE.

**NB:** ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1989; ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2018.