

ENCEFALOMIELITIS POR TESCHOVIRUS

RESUMEN

La encefalomiелitis por teschovirus, conocida anteriormente como enfermedad de Teschen (o encefalomiелitis por enterovirus), se describió por primera vez como una encefalomiелitis de los cerdos especialmente virulenta y con alta mortalidad. Está provocada por cepas del serotipo 1 del teschovirus porcino (TVP-1), del género Teschovirus de la familia Picornaviridae. En el Reino Unido se describieron por primera vez unas formas menos graves de la enfermedad, a la que se denominó enfermedad de Talfan, y en el continente europeo donde recibió el nombre de poliomiелitis suum o parálisis enzoótica benigna. Además de las cepas TVP-1, la forma más leve de la enfermedad puede ser provocada por otros tipos de TVP, incluyendo TVP-2, -3, -4, -5, -6, 9, y 10.

La enfermedad se describió por primera vez en Teschen, Checoslovaquia, en 1929. Durante los años 40 y 50 provocó pérdidas graves en varios países de Europa y se diseminó a otros continentes. Se han producido brotes de la enfermedad más recientes en Haití y en la República Dominicana. Por lo demás, la enfermedad clínica es poco frecuente, y no se han descrito casos en Europa Occidental desde 1980. Sin embargo, ha existido evidencia serológica de que en las poblaciones de cerdos circulan variantes del virus que no son patógenas o presentan una patogenicidad baja.

Identificación del agente: *El virus presenta afinidad por el sistema nervioso central, y, por lo tanto, las suspensiones de encéfalo y médula espinal realizadas a partir de los cerdos afectados se utilizan como inóculo para el aislamiento del virus. El virus se propaga con éxito en las monocapas derivadas de tejido porcino, en particular del riñón. Si el TVP se encuentra presente, da lugar a efectos citopáticos específicos que se caracterizan por células redondeadas y refráctiles. Para la identificación del TVP y la serotipificación se emplean pruebas adecuadas utilizando antisueros específicos o anticuerpos monoclonales frente a cepas estándar de TVP. Las pruebas preferidas son las de neutralización vírica y las de inmunofluorescencia indirecta. Es posible la amplificación de las partes del genoma vírico mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa, pero, hasta ahora, no se ha aceptado formalmente ninguna prueba específica para el diagnóstico.*

Pruebas serológicas: *El que una sola prueba serológica para TVP-1 ofrezca resultados positivos no indica que los síntomas neurológicos observados se deban a una infección con TVP-1, dado que su prevalencia en poblaciones de cerdos sanos en Europa Central puede superar el 60%, y otros virus pueden causar síntomas clínicos idénticos, incluyendo otros serotipos de TVP. Un incremento de cuatro veces en el título, junto con los signos típicos, debería considerarse un indicio de que la infección por TVP-1 ha causado la enfermedad clínica. Para detectar anticuerpos específicos en las granjas porcinas, se recomienda utilizar el enzoinmunoanálisis o la prueba de neutralización vírica en placas de microensayo.*

Requisitos para las vacunas: *Las vacunas estaban disponibles y se utilizaban cuando la enfermedad clínica era común. Sin embargo, dado que la enfermedad actualmente es muy infrecuente, no hay vacunas disponibles.*

A. INTRODUCCIÓN

La encefalomiелitis por teschovirus (anteriormente enfermedades de Teschen/Talfan y posteriormente encefalomiелitis por enterovirus) es una enfermedad aguda de los cerdos que se caracteriza por trastornos del sistema nervioso central (SNC). Teschen es el nombre de la ciudad de la República Checa donde la enfermedad fue descrita por primera vez, en 1929 (Klobouk, 1931; 1933). En los años 50, la enfermedad se extendió por toda

Europa y causó pérdidas enormes para la industria porcina. Procesos menos graves de la enfermedad se diagnosticaron por primera vez en el Reino Unido, donde se la denominó enfermedad de Talfan, y en Dinamarca, donde se llamó *poliomiелitis suum*; se trataba de enfermedades zoonóticas benignas del ganado porcino. La encefalomiелitis por Teschovirus no se ha descrito en el oeste de Europa desde 1980 (Austria), y actualmente dicha enfermedad se considera rara. En los últimos 12 años (desde 1996), los siguientes países han comunicado la enfermedad a la OIE: Bielorusia (1996, 1999 y 2005), Japón (2002), Letonia (1997 y 2000–2002), Uganda (2001) y Ucrania (1996–2005). En la mayoría de los casos, no se sabe si el diagnóstico se hizo solo sobre fundamentos clínicos o conjuntamente con pruebas de laboratorio: la excepción fue Japón en 2002 (Yamada *et al.*, 2004).

El agente causal de la encefalomiелitis por teschovirus es el serotipo del teschovirus porcino (TVP-1), que pertenece a la especie *Teschovirus A*, del género *Teschovirus*, en la familia *Picornaviridae* (Betts, 1960; Klobouk, 1933; Knowles *et al.*, 2012). Originalmente, los PVT se clasificaron dentro del género *Enterovirus* y los 11 serotipos de enterovirus porcinos originales, del PEV-1 al PEV-11, se agruparon en tres grupos – I, II y III –, según el efecto citopático (ECP) producido, las pruebas serológicas y la replicación en diferentes cultivos celulares (Knowles *et al.*, 1979). Del PEV-1 al PEV-7 y del PEV-11 al PEV-13 se identificaron como grupo I. Basándose en la secuenciación de nucleótidos y el análisis filogenético, el grupo I del virus PEV ha sido ubicado dentro del género *Teschovirus*. Del PEV-1 al PEV-7 han sido red denominados como TVP-1 a PVT-7, y del PEV-11 al 13 han pasado a denominarse PVT-8 a 10. Se han descrito también tipos adicionales, del TVP-11 al PVT-13 (en base a diferencias en la secuencia de nucleótidos para la VP1) (Boros *et al.*, 2012; Cano-Gómez *et al.*, 2011; Krumbholz *et al.*, 2002). El grupo II de PEV contiene el PEV-8, que ahora se ha reclasificado como sapelovirus 1 porcino, especie *Sapelovirus A*, género *Sapelovirus*. El grupo III se componía del PEV-9 y del PEV-10, y ahora se ha reclasificado como enterovirus G1 y G2, especie *Enterovirus G*, género *Enterovirus*.

En febrero de 2009, se produjeron en Haití brotes intensos de encefalomiелitis por teschovirus en cerdos, y se aisló TVP-1 de muestras de encéfalo de cerdos enfermos. Los análisis filogenéticos del gen de la proteína indicaron que la cepa haitiana estaba estrechamente relacionada con otras cepas de TVP-1, como la cepa Konratice, que se aisló en la República Checa de cerdos con la enfermedad de Teschen (Deng *et al.*, 2012). Los estudios de vigilancia indicaron que la infección era prevalente en varias regiones de Haití y de la República Dominicana.

Se han aislado TVP-2, -3, -4, -5, -6, -9 y -10 a partir de cerdos con formas de la enfermedad más leves (Witte von *et al.*, 1994). A menudo, las infecciones por PVT no producen síntomas. Los serotipos se pueden diferenciar mediante la prueba de neutralización vírica (NV) (Betts, 1960; Knowles *et al.*, 1979), la prueba de fijación del complemento (Knowles & Buckley, 1980) o la de inmunofluorescencia indirecta (IFI) (Auerbach *et al.*, 1994; Romanenko *et al.*, 1982).

Las infecciones por PVT solamente tienen lugar en el ganado porcino (incluidos los jabalíes); no existen indicios de que otras especies animales, incluido el ser humano, sean susceptibles.

El diagnóstico diferencial incluye la pseudorrabia (enfermedad de Aujeszky) y la peste porcina clásica (en su forma aguda). Además, la encefalitis japonesa, *Streptococcus suis* y la encefalomiелitis hemoaglutinante pueden producir ocasionalmente síntomas similares. También deberían considerarse las etiologías no infecciosas, en particular las toxicológicas.

El TVP puede identificarse serológicamente utilizando antisueros estandarizados que se han preparado mediante hiperinmunización de cobayas, conejos, o lechones privados de calostro con cepas estándar de TVP de los serotipos 1–11; por lo que se sabe, no existen este tipo de reactivos para los tipos 12 y 13.

El virus penetra en el animal por las cavidades oral o nasal. El periodo de incubación es de aproximadamente 14 días. Los principales síntomas de la fase prodrómica son fiebre de hasta 41.5°C, letargia, anorexia y trastornos locomotores. Esta fase continúa con hipersensibilidad, temblores, espasmos clónicos de las patas, parálisis flácida, opistótonos y nistagmo; pueden observarse convulsiones en los cerdos jóvenes. En el estadio clínico final, se observa una parálisis desde el tercio posterior a través de los lomos hasta el anterior. La parálisis del centro termorregulador da lugar a hipotermia. Cuando los músculos respiratorios se paralizan, el animal muere por asfixia.

Para el diagnóstico histológico, se recogen muestras de encéfalo, cerebelo, diencéfalo, bulbo raquídeo y médula espinal cervical y lumbar. Las muestras se fijan con formaldehído y los cortes se tiñen empleando los métodos histológicos convencionales. El virus se multiplica en el sistema nervioso central (SNC) causando polioencefalomiелitis no supurativa con pliegues perivasculares linfocíticos, especialmente en la médula espinal (Klobouk, 1931). Los cambios patológicos se observan en la materia gris del diencéfalo, cerebelo, bulbo raquídeo y en los cuernos ventrales de la médula espinal, incluyendo sistemáticamente los ganglios de la raíz dorsal y los ganglios trigéminos (ganglioneuritis) y, en menor medida, en los hemisferios encefálicos. Las lesiones pueden incluir los cuernos dorsales de la médula espinal en los animales muy jóvenes. En la fase final de la enfermedad, la degeneración de las neuronas (inflamaciones, cromatólisis, necrosis, neuronofagia, degeneración axonal) y su

sustitución por microgliosis (astrocitosis, astroglosis) se desarrollan en la última etapa de la enfermedad. (Cantile & Youssef, 2016).

La detección de los antígenos de teschovirus mediante inmunohistoquímica en secciones de SNC fijadas e incluidas en parafina es muy difícil y no siempre es posible. Si se dispone de antisueros específicos o anticuerpos monoclonales, así como de técnicas de detección específicas, puede ser posible establecer la correlación de los cambios patológicos con la localización del agente, utilizando secciones del SNC fijadas e incluidas en parafina.

El diagnóstico laboratorial de la enfermedad se basa en la identificación del virus en el SNC de los cerdos afectados y en la detección de anticuerpos específicos en la sangre de los animales convalecientes.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la Encefalomiелitis por Teschovirus y su propósito

Método	Propósito					
	Demostrar 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 en animales o poblaciones tras la vacunación
Identificación del agente¹						
Aislamiento del virus	–	+++	–	+++	+	–
Detección de antígeno	–	–	–	++	++	–
RT-PCR en tiempo real	–	+	–	++	++	–
Detección de respuesta inmunitaria						
AGID	–	–	–	+	–	–
CF	–	–	–	++	–	–
ELISA	–	–	–	++	+	–
VN	–	–	–	+++	+++	+++

Clave: +++ = método recomendado, validado para este propósito; ++ = método idóneo pero que puede precisar una posterior validación; + = puede utilizarse en algunas situaciones, pero el coste, la fiabilidad y otros factores limitan mucho su aplicación; – = no adecuado para este propósito; n/a = no aplicable.

RT-PCR = reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa; AGID = inmunodifusión en gel de agar; CF = fijación del complemento; ELISA = enzimoimmunoanálisis; VN = prueba de neutralización vírica

1. Identificación del agente

1.1. Aislamiento del virus

El progreso en el diagnóstico de la encefalomiелitis por teschovirus y la producción de vacunas ha sido posible mediante la propagación del virus en cultivos celulares (Madr, 1959; Mayr & Schwoebel, 1957).

Las muestras de encéfalo y médula espinal se recogen a partir de cerdos sacrificados en una fase clínica inicial de la enfermedad. Cuando no se procesan inmediatamente, las muestras deberán colocarse en una solución preparada a partes iguales de solución salina tamponada con fosfatoisotónico (PBS), pH 7,4, y glicerol. Se pican trozos del tejido hasta preparar una suspensión al

¹ Se recomienda aplicar una combinación de métodos de identificación a una misma muestra clínica.

10% (p/v) en PBS. La suspensión se centrifuga a 800 **g** durante 10 minutos y el líquido sobrenadante se utiliza para inocular cultivos celulares. Los cultivos primarios de riñón porcino en monocapa o las líneas celulares derivadas de tejido porcino son adecuados para el aislamiento del TVP.

1.1.1. Procedimiento analítico

- i) Se utilizan tubos de ensayo o frascos de cultivo celular con cultivos celulares en monocapa. Se desecha el medio de cultivo y los tubos o frascos se inoculan con 0,1 ml del homogeneizado tisular sospechoso.
- ii) Los tubos de ensayo inoculados se colocan en un tambor giratorio, y los frascos de cultivo de tejidos se colocan en una bandeja y se incuban durante 1 hora a 37°C.
- iii) Se desecha el inóculo; los tubos o los frascos de cultivo de tejido se lavan con PBS y se rellenan con 1–20 ml (dependiendo del tipo de frasco de cultivo de tejido empleado) de medio de mantenimiento sin suero bovino.
- iv) Los tubos se examinan cada día microscópicamente. Si la muestra contiene TVP, se observarán el ECP característico después de 3–4 días. El ECP se caracteriza por pequeños focos de células redondeadas refráctiles. Después de varios pases, el virus crece mejor y produce un ECP completo. La identidad del TVP se puede confirmar mediante la utilización de un antisuero específico o de anticuerpos monoclonales. La prueba de NV o de IFI son las más adecuadas para este fin. Una vez se ha identificado un aislamiento serológicamente como TVP, la inoculación en lechones es la única forma segura para determinar que un aislamiento concreto es patógeno.

1.2. Prueba de neutralización vírica para la identificación del teschovirus porcino

Los virus recogidos a partir de los cultivos celulares se diluyen en un medio de mantenimiento de cultivo celular en un rango de 10^{-1} a 10^{-6} en diluciones decimales. Para la serotipificación de los teschovirus, se preparan 12 filas de cada dilución; se añaden 50 μ l de antisuero estándar frente a TVP-1–11 diluido 1/10 a las filas 1–11, y 50 μ l de suero negativo a la última fila; si se dispone de antisueros frente a los tipos 12 y 13, se precisará una segunda placa. Las mezclas se incuban durante la noche a 4°C o durante 1 hora a 37°C, y a continuación se inoculan en cultivos en tubos o en los pocillos de placas de microtitulación con monocapas de células confluentes. Los cultivos celulares inoculados se incuban a 37°C. La valoración se realiza 72 horas más tarde y cada día siguiente hasta el día 10, dependiendo de cuándo se observe el ECP. La identificación de un serotipo de TVP se confirma si el título del virus aislado en presencia de antisuero es al menos 10^3 veces menor que el del virus incubado con suero negativo.

1.3. Inmunofluorescencia indirecta para la confirmación del antígeno teschovírico porcino en las células

La prueba IFI se basa en la reacción de los antígenos de las células infectadas con anticuerpos específicos del suero positivo (Romanenko *et al.*, 1982). La reacción se visualiza mediante una inmunoglobulina conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC), empleando un microscopio con una fuente de luz UV o azul. El antígeno se puede detectar en las células 12 horas después de la infección con TVP, es decir, antes del desarrollo del ECP. Los anticuerpos policlonales a menudo muestran reactividad cruzada con diferentes tipos de TVP, lo que puede provocar una interpretación errónea de los resultados.

1.3.1. Procedimiento analítico

- i) Las monocapas de células de riñón porcino crecidas sobre cubreobjetos se inoculan con el material sospechoso. Deben procesarse controles positivos y negativos en paralelo con las muestras problema.
- ii) Después de incubar durante 12–16 horas, se retiran los cubreobjetos, se lavan dos veces en PBS y se secan y fijan en acetona fría durante 5–15 minutos.
- iii) Los cubreobjetos se colocan en una cámara húmeda y se cubren con suero hiperinmune de conejo o de cerdo anti-TVP diluido al 1/10 con PBS (dilución óptima), o con un anticuerpo monoclonal específico para TVP a la dilución de trabajo.
- iv) La cámara húmeda se cierra y se incuba a 37°C durante 60 minutos.
- v) Se retiran los cubreobjetos y se lavan tres veces en PBS, a continuación se cubren con suero anti-conejo conjugado con FITC o suero de cabra anti-cerdo a la concentración de trabajo previamente establecida, y se incuban a 37°C durante 30 minutos.

- vi) Los cubreobjetos se lavan después 3 veces con PBS, se secan al aire y se montan en glicerol tamponado con 0,1 M Tris, pH 8,6.

Después de procesarse, los cubreobjetos se examinan al microscopio. Primero se examinan los portas control para confirmar si la fluorescencia observada es específica. La fluorescencia tiene un color verde manzana y aparece en el citoplasma de la célula y en la periferia del núcleo. En lugar de los cubreobjetos también pueden usarse portas o portas multipocillo.

1.4. Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa

La reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) proporciona un método para la detección y diferenciación de regiones génicas específicas del teschovirus porcino (Palmquist *et al.*, 2002; Zell *et al.*, 2000). La RT-PCR anidada con grupos específicos de cebadores se ha utilizado para distinguir entre los PVT y los PEV (Zell *et al.*, 2000). La PCR es más rápida y menos laboriosa que el aislamiento vírico mediante cultivo de tejidos y la serotipificación. Sin embargo, actualmente la técnica de PCR se encuentra restringida a laboratorios especializados.

2. Pruebas serológicas

Debido a que en algunos países de Europa Central la prevalencia del TVP-1 puede sobrepasar el 60% en las poblaciones de cerdos sanos, y que otros virus pueden causar sintomatología idéntica – incluidos otros serotipos de TVP –, el que un solo ensayo serológico para TVP-1 dé resultados positivos, no indica que los síntomas neurológicos observados sean realmente causados por el TVP-1. Un incremento de cuatro veces en el título, junto con los síntomas típicos debe considerarse una prueba de enfermedad clínica causada por la infección con el TVP-1. Otra razón por la que se necesitan muestras de suero pareadas para confirmar la relevancia de los títulos es que se han descrito reacciones cruzadas con teschovirus huérfanos.

Los cerdos que se han recuperado de la enfermedad, o con enfermedad latente, producen anticuerpos específicos. Hay varios métodos serológicos disponibles para su detección, entre los cuales el más útil es el ensayo de NV por microtitulación que emplea cultivos celulares de riñón de cerdo (Mayr & Bibrack, 1971). Se ha desarrollado un ELISA que es más sensible y rápido (Hubschle *et al.*, 1983).

Para realizar el diagnóstico serológico es necesario tener cepas estándar de los serotipos de TVP propagadas en cultivos celulares y suero hiperimmune mono-específico para los tipos de TVP.

2.1. Cepas estándar de teschovirus porcinos

2.1.1. Características

Después de una larga experiencia, la cepa “Zabreh”, aislada en Checoslovaquia durante la época de máxima incidencia de la enfermedad, se seleccionó como la cepa estándar para inducir la forma grave de la encefalomiелitis por teschovirus. La patogenicidad de la cepa se mantiene mediante pases intraencefálicos en lechones sanos privados de calostro. El virus produce los síntomas típicos de la encefalomiелitis por teschovirus después de un periodo de incubación de 5–7 días. Deben usarse las siguientes cepas de los serotipos de TVP como cepas estándar para el diagnóstico serológico: tipo 1: Talfan; tipo 2: T80; tipo 3: O2b; tipo 4: PS36; tipo 5: F26; tipo 6: PS37; tipo 7: F43; tipo 8: V13; tipo 9: Ger-2899/84, tipo 10: Ger-460/88; tipo 11: Dresden, tipo 12: CC25/SPA/2006, tipo 13: wild boar/WB2C-TV/2011/HUN.

2.1.2. Reserva de virus

Las cepas estandarizadas se propagan en monocapas de cultivo de tejidos, bien de explantes primarios de riñones o testículos porcinos o en una línea celular establecida, por ejemplo PK-15. Se prepara una suspensión al 10% en PBS, pH 7,4, a partir del encéfalo o la médula espinal de lechones infectados experimentalmente con TVP. Algunos tipos se aíslan a partir de las heces. La suspensión se centrifuga y el sobrenadante se usa para la inoculación de los cultivos celulares. El procedimiento para el cultivo de TVP en cultivos celulares es como sigue:

Se retira el medio de crecimiento del cultivo celular y, después de lavar con tampón salino, las células se inoculan con la suspensión vírica a 37°C. El tamaño del inóculo deberá ser igual al 10% del medio de cultivo. Después de 1 hora de incubación a 37°C, se decanta el inóculo, se lava el recipiente de cultivo con tampón salino y las células se recubren con el volumen adecuado de medio libre de suero suplementado con antibióticos. El ECP aparece dentro de las 48 horas, y la monocapa se desintegra de manera más o menos completa durante las siguientes 48–72 horas. El desarrollo del ECP se acelera durante los siguientes tres a cinco pases en cultivo celular y aumenta la concentración de los viriones. La titulación del virus se

realiza en tubos de ensayo o en placas de microtitulación. Normalmente, una cepa adaptada a la célula alcanza títulos de DICC₅₀ (dosis infectiva 50% en cultivo celular) de 10⁶–10⁷ por ml.

La especificidad del sobrenadante recogido se controla empleando un antisuero específico hiperinmune conocido. Para excluir la contaminación con otros virus se emplean el tratamiento con cloroformo al 5% y la siembra en cultivos celulares humanos y bovinos, y en embriones de pollo. El TVP es resistente al cloroformo y se multiplica solamente en cultivos de origen porcino. La inmunofluorescencia es útil para detectar posibles contaminantes que también son resistentes al cloroformo y se propagan en células de origen porcino (por ejemplo, parvovirus), o que no son citopáticos. El virus reserva se distribuye en pequeñas alícuotas y se conserva a –60°C. El virus congelado retiene sus propiedades durante varios años. Se recomienda una dosis constante de 100 DICC₅₀ para el concentrado de virus que va a usarse en la prueba de neutralización.

2.2. Suero hiperinmune específico

El suero hiperinmune específico se obtiene mediante la inmunización repetida con TVP, de cobayas, conejos o lechones privados de calostro. Aunque los animales se seleccionan a partir de camadas libres de patógenos específicos, aún así se prueban antes de la inmunización para confirmar la ausencia de anticuerpos frente a TVP. Deben usarse las cepas estandarizadas. Los conejos se inmunizan bien intravenosamente, empleando solamente la suspensión vírica, o subcutánea o intraperitonealmente utilizando la suspensión vírica con un 10% de adyuvante oleoso. Pueden obtenerse buenos resultados administrando tres dosis de 2 ml de suspensión vírica+ 0,2 ml de adyuvante oleoso a intervalos de 2 semanas. Los conejos se sangran 10 días después de la última inmunización. Los lechones se inmunizan de la misma manera. Los sueros concentrados se clarifican mediante centrifugación y se almacenan en pequeñas alícuotas a –20°C. Los sueros se titulan empleando una técnica de neutralización con antígeno constante. Solamente pueden utilizarse para la identificación vírica los sueros con un título de anticuerpo de al menos 1/256.

2.3. Prueba de neutralización vírica en placas de microtitulación

La prueba se realiza en placas de microtitulación de cultivo celular de fondo plano, usando células porcinas de riñón o testículos con pocos pases, o líneas celulares de origen porcino. El concentrado vírico se cultiva en monocapas celulares. El virus obtenido a partir de los cultivos celulares se clarifica mediante centrifugación y se almacena en alícuotas a –70°C. Como diluyente se utiliza medio de cultivo, como el medio completo de Eagle o LYH (solución salina equilibrada de Hanks con extracto de levadura, lactoalbúmina y antibióticos). El virus obtenido de los cultivos celulares se clarifica mediante centrifugación y se almacena en alícuotas a –70°C o como una mezcla de 50/50 con glicerol y puede almacenarse a –20°C.

2.3.1. Procedimiento analítico

- i) Se inactiva el suero porcino durante 30 minutos a 56°C.
- ii) Los sueros que van a ensayarse se diluyen en medio de cultivo celular en diluciones dobles desde 1/2 a 1/64, cuatro pocillos por dilución y volúmenes de 50 µl por pocillo.
- iii) Los controles incluyen sueros positivos y negativos, células y medio de control.
- iv) Se añaden a cada pocillo 50 µl del concentrado vírico diluido previamente en medio de cultivo para proporcionar 100 DICC₅₀.
- v) Se incuba durante 1 hora a 37°C con las placas tapadas. También se incuba el concentrado vírico sobrante.
- vi) Se repiten las titulaciones del concentrado vírico sobrante en cuatro diluciones decimales seriadas empleando 50 µl por pocillo y cuatro pocillos por dilución.
- vii) Se añaden 50 µl de una suspensión de células renales porcinas a 5 × 10⁵ por ml.
- viii) Después de agitar, se colocan las tapas sobre las placas y se incuban a 37°C en una atmósfera del 5% de CO₂ durante 2–3 días o más tiempo, hasta un máximo de 8 días.
- ix) Se examinan las placas al microscopio para observar el ECP. El ensayo deberá validarse controlando la titulación repetida del virus y la del suero control positivo. Los virus deben proporcionar un valor de DICT₅₀ de 100, con un rango permisible de 30–300. El suero positivo estandarizado debe dar un título dentro de 0,3 log₁₀ unidades a partir de la media predeterminada. Un suero negativo no debería dar neutralización a la dilución ensayada más baja, por ejemplo 1/2.

- x) Los resultados de la NV se determinan mediante el método de Spearman–Kärber como la dilución de suero que neutralizó el virus en el 50% de los pocillos.
- xi) Los títulos de neutralización vírica se consideran positivos si el suero correspondiente neutraliza al virus a una dilución inicial del suero de 1/8 o más alta.

2.4. Enzoinmunoanálisis

Un método alternativo para la detección y titulación de anticuerpos específicos frente a TVP es el método ELISA (Hubschle *et al.*, 1983). La prueba se realiza en placas de microtitulación empleando como antígeno el TVP crecido en cultivos celulares. La técnica puede llevarse a cabo según los pasos siguientes.

2.4.1. Preparación del antígeno

- i) El virus se propaga en monocapas de cultivo celular, ya sean de riñón o de testículo porcino, o en una línea celular establecida, por ejemplo PK-15. Se retira el medio de crecimiento del cultivo celular y, tras aclarar con tampón salino, se inoculan las células con la suspensión del virus a baja multiplicidad de infección. Después de 30 minutos de incubación a 37°C, se cubren las células con un volumen adecuado de un medio libre de suero suplementado con un antibiótico. Se continúa con la incubación y se llevan a cabo observaciones microscópicas diarias. El ECP deberá producirse antes de 48 horas, y la monocapa se desintegra de forma más o menos completa durante las siguientes 48–72 horas. Una cepa adaptada a la célula normalmente alcanza un valor DICT₅₀ (*dosis infectiva en el 50%* de los cultivos celulares expuestos) de 10⁶–10⁷ por ml.
- ii) El virus cultivado se clarifica mediante la centrifugación a 200 **g** durante 15 minutos, y entonces se precipita con una solución saturada de (NH₄)₂SO₄ al 50% durante 120 minutos a 4°C.
- iii) Después de centrifugar a 2.000 **g**, el precipitado resultante se resuspende hasta 1/100 del volumen inicial en tampón TEN (Tris-hidroximetil-metilamina [0,01 M], ácido etilendiamino tetraacético [1 mM] y Na Cl [0,15 M]), pH 7,4.
- iv) La suspensión vírica concentrada se extrae mediante la agitación con freón 3/1 durante 10 minutos a 4°C.
- v) Después de una centrifugación, el sobrenadante se divide en dos fases separadas. La fase superior acuosa que contiene el antígeno vírico se desala mediante el paso a través de una columna de 2,5 x 40 cm empaquetada con Sephadex G 25.
- vi) La solución vírica se concentra finalmente mediante la ultracentrifugación a 160.000 **g** durante 3 horas.
- vii) El precipitado se resuspende a aproximadamente una milésima parte del volumen inicial del virus en tampón TEN, pH 7,4.
- viii) Las proteínas insolubles se separan mediante una centrifugación suave, y el sobrenadante se usa como el antígeno positivo en el ELISA.

2.4.2. Procedimiento analítico

- i) Las placas se sensibilizan con antígeno prediluido en solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,2, añadiendo 100 µl en cada pocillo. La adsorción del antígeno a la superficie de la placa tiene lugar durante la noche a 4°C. Deben tratarse en paralelo varias filas o columnas de la placa con antígeno negativo.
- ii) La placa se lava cinco veces con PBS para eliminar el exceso de antígeno.
- iii) Los sueros problema se diluyen al 1/20 con PBST (solución de PBS que contiene un 0,05% de Tween 20). Se colocan 50 µl del suero diluido en cada uno de dos pocillos con antígeno positivo y en dos pocillos con antígeno negativo (el antígeno negativo se prepara como se describió anteriormente, excepto que el cultivo celular no se inocula con el virus y las células se destruyen mediante congelación). La placa se incuba durante 1 hora a 37°C.
- iv) Las placas se lavan cinco veces con PBST.
- v) Se añade una dilución predeterminada de peroxidasa de rábano picante conjugada con inmunoglobulina anti-porcina preparada en conejos, en una cantidad de 50 µl por pocillo. Las placas se incuban durante 1 hora más a temperatura ambiente.

- vi) Las placas se lavan cinco veces con PBS.
- vii) Se añade la solución de sustrato (0,1% ortofenil-endiamina con peróxido de hidrógeno al 0,03% en PBS, pH 6,0) en una cantidad de 100 µl por pocillo.
- viii) Después de la adición del sustrato, las muestras positivas cambian de color a marrón oscuro. La reacción se detiene mediante la adición de 50 µl de ácido sulfúrico 2 M a cada pocillo, cuando en los pocillos de los sueros testigo positivos se observa un grado suficiente de reacción de color. La absorbancia de los pocillos se mide a una longitud de onda de 492 nm, preferiblemente utilizando un espectrofotómetro automático multicanal con un mecanismo de impresión. Los sueros testigo positivos y negativos y las células no infectadas deben procesarse como controles en paralelo con las muestras problema.
- ix) La absorbancia de un suero es la media de la lectura de dos pocillos con antígeno positivo menos la media de la lectura de dos pocillos con antígeno negativo. Las lecturas de absorbancia de los sueros problema que superen en más de dos veces la media de las lecturas de los sueros negativos estándar se consideran positivas.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

1. Vacunas frente a la encefalomiелitis por teschovirus

La inmunoprofilaxis activa fue una medida importante para el control de esta infección durante el periodo de más alta incidencia de la enfermedad en Europa Central y Madagascar (Traub, 1942). Como la enfermedad clínica grave ha desaparecido, la vacunación se ha abandonado y no sigue produciéndose la vacuna ni se utiliza en ningún lugar del mundo.

BIBLIOGRAFÍA

AUERBACH J., PRAGER D., NEUHAUS S., LOSS U. & WITTE K.H. (1994). Grouping of porcine enteroviruses by indirect immunofluorescence and description of new serotypes. *J. Vet. Med. [B]*, **41**, 277–282.

BETTS A.O. (1960). Studies on enteroviruses of the pig. VI. The relationship of the T 80 strain of a swine polioencephalomyelitis virus to some other viruses as shown by neutralization tests in tissue cultures. *Res. Vet. Sci.*, **1**, 296–300.

BOROS A., NEMES C., PANKOVICS P., KAPUSINSZKY B., DELWART E. & REUTER G. (2012). Porcine teschovirus in wild boars in Hungary. *Arch. Virol.* **157**, 1573–1578.

CANO-GOMEZ C., PALERO F., BUITRAGO M.D., GARCIA-CASADO M.A., FERNANDEZ-PINERO J., FERNANDEZ-PACHECO P., AGUERO M., GOMEZ-TEJEDOR C. & JIMENEZ-CLAVERO M.A. (2011). Analyzing the genetic diversity of teschoviruses in Spanish pig populations using complete VP1 sequences. *Infect. Genet. Evol.*, **11**, 2144–2150.

CANTILE C. & YOUSSEF S. (2016). Nervous System. In: Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals, Grant Maxie M., eds. Elsevier, St. Louis, Missouri, USA, 372–373.

DENG M.Y., MILLEN M., JACQUES-SIMON R., FLANAGAN J.K., BRACHT A. J., CARRILLO C., BARRETTE R. W., FABIAN A., MOHAMED F., MORAN K., ROWLAND J., SWENSON S. L., JENKINS-MOORE M., KOSTER L., THOMAS B. V., MAYR G., PYBURN D., MORALES P., SHAW J., BURRAGE T., WHITE W., MCINTOSH M. & METWALLY S. (2012). Diagnosis of porcine teschovirus encephalomyelitis in the Republic of Haiti. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **24**, 671–678.

HUBSCHLE O.J.B., RAJOANARISON J., KOKO M., RAKOTONDRAMARY E. & RASOLFOMANANA P. (1983). ELISA for detection of Teschen virus antibodies in swine serum samples. *Dtsch Tierarztl. Wochenschr.*, **90**, 86–88.

KLOBOUK A. (1931). Encephalomyelitis enzootica suum. *Zverolekarsky obzor*, **24**, 436–480.

KLOBOUK A. (1933). Aetiology of the so-called Teschen disease – Encephalomyelitis enzootica suum. *Zverolekarske rozpravy*, **8**, 85–96.

KNOWLES N.J. & BUCKLEY L.S. (1980). Differentiation of porcine enterovirus serotypes by complement fixation. *Res. Vet. Sci.*, **29**, 113–115.

KNOWLES N.J., BUCKLEY L.S. & PEREIRA H.G. (1979). Classification of porcine enteroviruses by antigenic analysis and cytopathic effects in tissue culture: description of 3 new serotypes. *Arch. Virol.*, **62**, 201–208.

KNOWLES N.J., HOVI T., HYYPIÄ T., KING A.M.Q., LINDBERG A.M., PALLANSCH M.A., PALMENBERG A.C., SIMMONDS P., SKERN T., STANWAY G., YAMASHITA T. & ZELL R. (2012). *Picornaviridae*. In: *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B. & Lefkowitz E.J., eds. Elsevier, San Diego, USA, 855–880.

KRUMBHOLZ A., DAUBER M., HENKE A., BIRCH-HIRSCHFELD E., KNOWLES N.J., STELZNER A. & ZELL R. (2002). Sequencing of porcine enterovirus groups II and III reveals unique features of both virus groups. *J. Virol.*, **76**, 5813–5821.

MADR V. (1959). Propagation of the Teschen disease virus in cell cultures. *Veterinarstvi*, **IX**, 298–301.

MAYR A. & BIBRACK B. (1971). Demonstration of Teschen Talfan infection using a micromodification of neutralization test. *Zentralbl. Veterinarmed. [B]*, **18**, 657–664.

MAYR A. & SCHWOEBEL W. (1957). Propagation of the Teschen disease virus in porcine kidney cell cultures and properties of the cultured virus. 1.2.3. part. *Zentralbl. Bakteriol. [I. Orig.]*, **168**, 329–359.

PALMQUIST J., MUNIR S., TAKU A., KAPUR V. & GOYAL S.M. (2002). Detection of porcine teschovirus and enterovirus type II by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **14**, 476–480.

ROMANENKO V.F., PRUSS O.G., BELYI YU.A. & KUPNOVSKAYA L.V. (1982). Immunofluorescent diagnosis of porcine encephalomyelitis. *Veterinariia*, **4**, 69–72.

TRAUB E. (1942). Active immunization against Teschen disease using vaccines adsorbed on aluminium hydroxide. *Arch. Tierheilkd*, **77**, 52–66.

WITTE VON K.H., AUERBACH J., LOSS K.U., NEUHAUS S. & PRAGER D. (1994). Typisierung von 17 porzinen Enterovirusisolationen aus Polioenzephalomyelitisfällen der Jahre 1983–1991. *DTW Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.*, **101**, 453–492.

YAMADA M., KOZAKURA R., IKEGAMI R., NAKAMURA K., KAKU Y., YOSHII M. & HARITANI M. (2004). Enterovirus encephalomyelitis in pigs in Japan caused by porcine teschovirus. *Vet. Rec.*, **155**, 304–306.

ZELL R., DAUBER M., KRUMBHOLZ A., HENKE A., BIRCH-HIRSCHFELD E., STELZNER A., PRAGER D. & WURM R. (2001). Porcine teschoviruses comprise at least eleven distinct serotypes: molecular and evolutionary aspects. *J. Virol.*, **75**, 1620–1631.

ZELL R., KRUMBHOLZ A., HENKE A., BIRCH-HIRSCHFELD E., STELZNER A., DOHERTY M., HOEY E., DAUBER M., PRAGER D. & WURM R. (2000). Detection of porcine enteroviruses by nRT-PCR: differentiation of CPE groups I–III with specific primer sets. *J. Virol. Methods*, **88**, 205–218.

*
* *

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1991 COMO ENFERMEDAD DE TESCHEN:
ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2017.