

CAPÍTULO 3.9.3.

PESTE PORCINA CLÁSICA (INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA PESTE PORCINA CLÁSICA)

RESUMEN

La peste porcina clásica (PPC) es una enfermedad vírica contagiosa de los cerdos, incluidos el cerdo doméstico y el jabalí. El agente causal es un miembro del género Pestivirus de la familia Flaviviridae, estrechamente relacionado con los virus de la diarrea viral bovina y de la enfermedad de la frontera. Solo existe un serotipo de virus de la PPC (VPPC).

La enfermedad puede tener un desarrollo agudo, subagudo, crónico, de aparición tardía, inaparente o persistente, dependiendo de varios factores víricos y del hospedador, siendo los más importantes la edad de los animales, la virulencia y carga del virus y el tiempo de infección (pre- o post-natal). Los cerdos adultos suelen mostrar menos signos graves de la enfermedad que los jóvenes y tienen mayor probabilidad de supervivencia. En las cerdas gestantes, el virus puede atravesar la barrera placentaria e infectar a los fetos. La infección intrauterina con cepas del virus de baja o moderada virulencia origina lo que se conoce como el síndrome de la “cerda portadora”, que se caracteriza por la muerte prenatal o perinatal, el nacimiento de lechones enfermos o una camada aparentemente “sana” pero infectada persistentemente. El virus también puede inducir infección persistente tras la infección post-natal y puede transmitirse a las cerdas a través del esperma del macho. Un brote de PPC tiene graves consecuencias económicas para el mercado de los cerdos y de sus productos derivados.

La elevada variabilidad clínica de la PPC dificulta el diagnóstico realizado únicamente a partir de los signos clínicos y anatomopatológicos. Los métodos de laboratorio son, por tanto, esenciales para un diagnóstico inequívoco. La detección del virus, del ácido nucleico vírico en sangre total con anticoagulante y en amígdalas, y de anticuerpos en el suero son los mejores métodos para diagnosticar PPC en cerdos vivos, mientras la detección del virus, del ácido nucleico vírico o del antígeno en muestras de órganos resulta más adecuada en cerdos muertos.

Detección del agente: El aislamiento del VPPC se debe intentar en líneas celulares de riñón de cerdo (PK-15, SK-6) u otras líneas celulares que permitan el cultivo del VPPC. En los cultivos, que se generan a partir de reservas que están libres de Pestivirus (y preferiblemente libres de otros contaminantes, como micoplasmas o circovirus porcino), se comprueba si hay crecimiento del virus mediante inmunofluorescencia o tinción con inmunoperoxidasa; las cepas aisladas se caracterizan posteriormente por secuenciación génica parcial o, en el caso de que no se disponga de este método, utilizando anticuerpos monoclonales (MAb). Los protocolos basados en la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa para la identificación del ácido nucleico del VPPC se aceptan a nivel internacional y se están utilizando en muchos laboratorios, tanto para la detección del agente como para la diferenciación respecto a otros pestivirus. La prueba de la inmunofluorescencia directa (FAT) con cortes obtenidos mediante criostato de órganos de cerdos afectados puede utilizarse para detectar antígeno de la PPC. Se utiliza un grupo de MAb para determinar si la fluorescencia está causada por la PPC o por antígenos de Pestivirus distintos del de la PPC. Los ensayos de inmunoenzimología (ELISA) de captura de antígeno son también útiles para realizar un cribado en la piara pero no deben utilizarse en base a un solo animal.

Pruebas serológicas: La detección de los anticuerpos específicos contra el virus es particularmente útil en las piaras donde se sospecha una infección por VPPC iniciada al menos 21 días antes. Los métodos serológicos son también adecuados para el seguimiento y para estudios de prevalencia, y resultan esenciales en el caso de que un país desee el reconocimiento internacional de estar exento de la enfermedad sin vacunación.

Como en los cerdos se observan ocasionalmente anticuerpos contra VPPC que generan reacción cruzada con otros pestivirus, las pruebas de cribado deben ir seguidas de pruebas confirmativas que sean específicas del VPPC. Algunos ELISA son relativamente específicos del VPPC, pero el método de elección definitivo para la diferenciación es la neutralización comparativa, que permite comparar el título neutralizante de anticuerpos contra distintas cepas de Pestivirus.

Requisitos para las vacunas: Las vacunas modificadas (MLV) contra la PPC contienen el virus vivo que se ha atenuado mediante pases en cultivos celulares o a través de una especie hospedadora adecuada que no pertenezca a la familia Suidae. La producción de estas MLV se basa en un sistema de lotes de inóculo que validados respecto a la identidad del virus, la esterilidad, la pureza, la seguridad, la ausencia de transmisibilidad, la estabilidad y la inmunogenicidad.

No se dispone de vacunas convencionales eficaces con virus completos inactivados. Contrariamente a lo que ocurre con las vacunas de MLV convencionales, las “vacunas marcadoras” con una nueva generación de MLV permite inducir anticuerpos que pueden distinguirse de los anticuerpos inducidos por el virus natural en base a una prueba de diagnóstico discriminativa apropiada en algunas regiones y hay más en desarrollo. Las “vacunas marcadoras” de subunidad, basadas en la glicoproteína de envoltura mayor (subunidad E2) del VPPC se producen en células de insecto o de mamífero (dependiendo del sistema de expresión que se utilice).

A. INTRODUCCIÓN

Los virus que causan la peste porcina clásica (PPC), la diarrea viral bovina (DVB) y la enfermedad de la frontera (EF) son miembros de la familia Flaviviridae, género Pestivirus, y están estrechamente relacionados entre sí tanto antigénica como estructuralmente. Los signos clínicos y las lesiones observadas en el examen post-mortem de los cerdos afectados por PPC son muy variables debido a factores dependientes del virus y del hospedador. Además, las infecciones (congénitas) por pestivirus de rumiantes en el cerdo en ocasiones dar lugar a una enfermedad clínica que es indistinguible de la PPC. Blome *et al.* (2017c), Ganges *et al.* (2020), y Postel *et al.* (2018) han aportado revisiones recientes sobre la enfermedad.

La PPC afecta al sistema inmunitario, y la característica principal es una leucopenia generalizada, que a menudo puede detectarse antes de que empiece la fiebre. La inmunosupresión puede dar lugar a infecciones concomitantes que pueden enmascarar el cuadro clínico.

Los signos clínicos pueden variar mucho y dependen de muchos factores, como la edad de los cerdos afectados y la virulencia de la cepa vírica circulante. Los signos prevalentes de la enfermedad en todos los grupos de edad son pirexia, apiñamiento, falta de apetito, torpeza, debilidad, conjuntivitis y constipación, seguidos de diarrea. Además, los animales pueden presentar una marcha tambaleante, ataxia o convulsiones. Varios días después de la aparición de los signos clínicos, las orejas, el abdomen y la parte interna de los muslos pueden presentar especialmente hemorragias petequiales o un color morado. Los animales con la enfermedad aguda mueren en 1–4 semanas. La muerte súbita en ausencia de enfermedad clínica no un signo de la PPC.

En ciertas circunstancias determinadas por la edad de los animales, la raza, el estado de salud y la cepa del virus en cuestión, los animales infectados pueden desarrollar una enfermedad clínica subaguda o crónica, incluyendo formas subclínicas. Estas formas de infección pueden prolongarse durante varias semanas o meses, o incluso más. La enfermedad crónica provoca un retraso en el crecimiento, anorexia, pirexia intermitente y diarrea. Los animales con formas subclínicas pueden desarrollar infecciones persistentes, mostrando una carga viral variable, de alta a baja en suero en ausencia de inducción de anticuerpos.

Las infecciones congénitas persistentes pueden pasar desapercibidas durante meses y limitarse solo a unos cuantos lechones de la piara o afectar a una gran cantidad. Los lechones con infección persistente no producen anticuerpos contra el virus de la PPC (VPPC), sino viremia duradera y excreción vírica en la mayoría de los casos. Los signos clínicos son inespecíficos: debilidad en ausencia de pirexia. Las infecciones crónicas y persistentes siempre conducen a la muerte del animal. Las tasas de mortalidad en la piara pueden superar ligeramente el nivel esperado.

En casos agudos, las lesiones anatomopatológicas graves pueden ser a menudo poco llamativas, o puede no haberlas. En los casos más característicos, los ganglios linfáticos aumentan de tamaño y adquieren un tono rojo jaspeado, y se presentan hemorragias en la serosa y en las mucosas de los órganos intestinales. Pueden producirse infartos del bazo. En los casos subagudos y crónicos, además de las lesiones anteriores, pueden observarse úlceras necróticas o en “botón” en la mucosa del tracto gastrointestinal, la epiglotis, las amígdalas y la laringe.

Los hallazgos histopatológicos no son patognomónicos. Las lesiones pueden incluir una degeneración parenquimatosa del tejido linfático, proliferación celular del tejido vascular intersticial y una meningoencefalitis no supurativa, con o sin manguito perivascular.

La variabilidad de los signos clínicos y de las lesiones post-mortem no proporciona pruebas firmes para un diagnóstico inequívoco. Otras enfermedades víricas, como la peste porcina africana, el síndrome de dermatitis y nefropatía porcina (PDNS), y la enfermedad sistémica por PCV2 (PCV2-SD), la púrpura trombocitopénica y diversas afecciones septicémicas, como, entre otras, la salmonelosis (especialmente causada por *Salmonella choleraesuis*), la erisipela, la pasteurelisis, la actinobacilosis (causada por *Actinobacillus suis*) y las infecciones por *Haemophilus parasuis* pueden confundirse con la PPC aguda. De hecho, estas bacterias suelen causar infecciones concurrentes, y el aislamiento de estos agentes patógenos puede ocultar la infección por el virus de la peste porcina clásica como causa real de la enfermedad. Del mismo modo, la PDNS concurrente puede hacer que se pase por alto una infección subyacente de la PPC.

Por lo tanto, un diagnóstico tentativo basado en los signos clínicos y las lesiones post-mortem debe ser confirmado con pruebas de laboratorio. Con respecto al diagnóstico y la vacunación para la PPC, se han publicado revisiones recientes y se han definido las lagunas de investigación (Blome *et al.*, 2017b; Ganges *et al.*, 2020; Postel *et al.*, 2018).

No se conoce ningún riesgo de infección humana con el VPPC. El virus tiene un alto riesgo de propagación desde el laboratorio, y las medidas de biocontención deben determinarse mediante un análisis de riesgo como se describe en 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*. Los países que no tienen acceso a un laboratorio debidamente equipado deben enviar muestras a un laboratorio de referencia de la OIE.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la peste porcina clásica 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 agente^(a)						
Aislamiento del virus	–	+	–	+++	–	–
RT-PCR	+	+++	++	+++	++	–
ELISA (antígeno)	++	+	+	+	–	–
FAT	–	–	+	+	–	–
Detección de la respuesta inmunitaria						
ELISA (anticuerpo)	+++	+++	+++	–	+++	+++
VN (FAVN o NPLA)	+	+++	++	++	+++	+++

Clave: +++ = método recomendado; ++ = método idóneo;

+ = puede utilizarse en algunas situaciones; – = no adecuado para este propósito.

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

FAT = inmunofluorescencia directa; VN = neutralización vírica; FAVN = neutralización del virus con inmunofluorescencia;

NPLA = prueba de neutralización con unión a peroxidasa.

^(a)Se recomienda aplicar varios métodos de detección del agente patógeno a una misma muestra clínica.

La pirexia es uno de los primeros signos de la PPC y cursa con una viremia. La detección del virus o del ácido nucleico vírico en sangre completa, obtenida en heparina (puede interferir con la reacción en cadena de la polimerasa [PCR]) o, en ácido etilendiaminetetraacético (EDTA), o bien en tejidos (sobre todo en amígdalas) recogidos de animales febriles, es el método de elección para detectar las piaras infectadas en la fase inicial. Así, las pruebas de laboratorio serán esenciales teniendo en cuenta las graves consecuencias de un brote de PPC para el comercio de cerdos y de productos del cerdo.

El objetivo de los métodos de laboratorio para el diagnóstico de la PPC es detectar el virus, el ácido nucleico vírico o los anticuerpos víricos, o bien la detección de los anticuerpos específicos. Debe llevarse a cabo un muestreo dirigido y basado en el riesgo; un muestreo aleatorio solo se aplicará en los casos en que no haya signos clínicos de la enfermedad. Para aumentar la sensibilidad de la detección del virus, del antígeno vírico o de ácido nucleico vírico, principalmente deben tomarse muestras de animales con enfermedad clínica y de animales febriles. Para detectar anticuerpos, principalmente deben tomarse muestras de animales que se hayan recuperado de la enfermedad o de animales que hayan estado en contacto con otros que estuvieran infectados o enfermos.

Para una interpretación correcta de los resultados de estas pruebas, el veterinario que realice la inspección debe prestar especial atención a la presentación simultánea de dos o más de los signos predominantes de la enfermedad citados anteriormente. En los casos sospechosos primarios, un resultado positivo en una prueba inicial debe confirmarse con un segundo método de análisis.

Los anticuerpos aparecen en la tercera semana de la enfermedad y persisten en el animal superviviente durante años, o incluso durante toda la vida (excepto los casos crónicos). Los anticuerpos se generan 10-14 días post-vacunación y pueden persistir en los animales vacunados durante años o incluso más tras programas de vacunación extensa. Las muestras para la detección de los anticuerpos se recogen en tubos ordinarios (sin anticoagulante) a partir de cerdos convalecientes, piaras que hayan estado en contacto con la enfermedad y poblaciones post-vacunación. Todos los métodos y protocolos deben ser validados en el laboratorio respectivo, y debe demostrarse que el laboratorio puede llevar a cabo las pruebas de diagnóstico con resultados satisfactorios. Los laboratorios deben mantener una gestión de la calidad adecuada respecto a las pruebas que lleven a cabo y la validación debe efectuarse de acuerdo con la norma de validación de la OIE (véase el Capítulo 1.1.5 *Gestión de la calidad en los Laboratorios Veterinarios* y el Capítulo 1.1.6 *Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas*).

1. Identificación del agente

1.1. Aislamiento del virus

El aislamiento del virus en cultivos celulares es un método más sensible pero más lento de diagnóstico de la PPC que la inmunofluorescencia con cortes congelados. Pueden utilizarse preparaciones de órganos, preparaciones de leucocitos, muestras de sangre total, suero, plasma, hisopos o esperma. El aislamiento se realiza mejor en células PK-15 utilizadas como monocapa pre-formada o sembradas como suspensión celular para la infección simultánea con una suspensión al 2% de la amígdala u otra muestra adecuada en medio de crecimiento. También pueden utilizarse otras líneas de células porcinas, pero debe demostrarse que son al menos tan sensibles como las células PK-15 para el aislamiento del VPC, y deben estar libres tanto de pestivirus como de anticuerpos contra pestivirus. En general, resulta ventajoso utilizar más de una línea de células porcinas para la inoculación, con el fin de aumentar la probabilidad de un resultado positivo. Dado que el cultivo del virus no causa un efecto citopático, su presencia debe constatare mediante inmunotinción, que puede llevarse a cabo tras uno (cuando se utiliza para fines de cribado) o dos pases del virus. Ello puede realizarse comprobando si los cultivos presentan focos de fluorescencia, mediante FAT tras preferiblemente 72 horas (mínimo de 2 días y máximo de 5 días), o bien mediante tinción con inmunoperoxidasa después de 3-4 días de incubación. NB: siempre deben incluirse controles positivos y negativos.

El tejido de las amígdalas es el más adecuado para el aislamiento del virus de cerdos que han muerto o han sido sacrificados con fines de diagnóstico. Como alternativa, también puede utilizarse bazo, riñón, íleon o ganglios linfáticos, o bien añadir estas muestras a las de amígdala.

El suero fetal bovino (FBS) que se utilice en cualquier prueba de diagnóstico siempre debe estar libre de pestivirus y de anticuerpos contra pestivirus. Podría no ser suficiente confiar en la declaración de los fabricantes, y por ello es recomendable que se compruebe en cada lote de FBS si presenta pestivirus o anticuerpos contra pestivirus antes de utilizarlo en pruebas de diagnóstico. El porcentaje de FBS (5-10%)

en el medio de crecimiento depende de las condiciones utilizadas para la adaptación y propagación de las células en cada laboratorio.

1.1.1. Aislamiento del virus – Procedimiento analítico 1

- i) Se prepara una solución base concentrada 100 veces de glutamina-antibiótico: se disuelve la glutamina (2,92 g) en 50 ml de agua destilada (solución A) y se esteriliza por filtración. Se disuelve cada uno de los siguientes antibióticos en 5–10 ml de agua destilada estéril: penicilina (10^6 Unidades Internacionales [UI]; estreptomycin (1 g); micostatina (5×10^5 U); polimixina B (15×10^4 U); y kanamicina (1 g). Se combinan estas soluciones (solución B). Se mezclan asépticamente las soluciones A y B, y se completa hasta 100 ml con agua destilada estéril y se guarda a -20°C en alícuotas de 5 ml. La constitución exacta del antibiótico no es definitiva siempre que se consiga la esterilidad y las células no estén afectadas.
- ii) Se cortan en trozos pequeños 1–2 g de tejido (muestra de órgano de alrededor de 1 cm^3) y se machacan en un mortero u otro aparato con arena estéril y un pequeño volumen de medio de cultivo hasta formar una pasta homogénea. Alternativamente, se puede utilizar una trituradora o un homogeneizador automático a 4°C ; en este caso, las muestras de órganos se cortan en trozos con una hoja de bisturí y se ponen 10-30 mg (o una cantidad adecuada para el homogeneizador que se use) en un tubo. (Atención: las velocidades altas pueden calentar la muestra y reducir la viabilidad del virus!)
- iii) Se prepara una suspensión al 10% (p/v) añadiendo solución salina equilibrada de Hanks (BBS) o medio mínimo esencial (MEM) de Hanks; por cada 10 ml de suspensión, se añade 1 ml del base de glutamina-antibiótico. La mezcla se mantiene a temperatura ambiente durante 1 hora.
- iv) Se centrifuga a 1.000 - 2.500 *g* durante 15 minutos. El sobrenadante se utiliza para inocular los cultivos celulares. Puede procesarse una dilución de 1/100 paralelamente en caso de efectos citotóxicos. Puede realizarse una filtración estéril, si se considera necesario utilizando filtros de jeringa (de $0,45\ \mu\text{m}$, seguidos de filtros de $0,22\ \mu\text{m}$).
- v) Se tripsiniza una monocapa de células PK-15, se centrifuga la suspensión celular a 160 *g* durante 10 minutos. El sobrenadante se desecha y el precipitado se vuelve a suspender hasta que contenga aproximadamente 2×10^6 células/ml en medio de cultivo (MEM de Eagle con sales de Earle; 5-10% de FBS libre de pestivirus de rumiantes y de anticuerpos contra pestivirus; y 0,2 ml de la solución base de glutamina-antibiótico por cada 10 ml de la suspensión celular). Como guía, un frasco de cultivo celular de 75 cm^2 dará aproximadamente 50 ml de suspensión celular a la concentración adecuada. Normalmente contiene unas $8,5 \times 10^6$ células.

Como alternativa, puede aplicarse un protocolo sin centrifugación:

Se retira el medio de cultivo de una monocapa de PK-15 y las células se lavan una o dos veces con 5 ml de una solución ajustada de tripsina/versen (ATV) (5 ml de ATV para un frasco de cultivo celular de 250 ml). La solución ATV se retira y se sustituye por solución ATV nueva (2 ml de ATV para un frasco de cultivo celular de 250 ml). El frasco de cultivo celular se incuba a 37°C durante 5-15 minutos o hasta que las células se desprendan. A continuación, se llena con medio de cultivo celular que contenga un 5-10% de FBS (8 ml de medio para un frasco de cultivo celular de 250 ml) y las células se resuspenden.

- vi) O bien:

Inoculación de la suspensión. Se mezclan nueve partes de la suspensión celular (del paso (v)) y una parte del líquido sobrenadante problema (del paso (iv)) y se inoculan 1,0–1,5 ml en 6–8 tubos Leighton con cubreobjetos, o en otros frascos o placas de cultivo celular apropiados. Tres tubos se inoculan como controles con solo 1,0–1,5 ml de suspensión celular. Después de completar las inoculaciones de la muestra, se inoculan tres tubos como controles positivos con VPPC. Hay que tener cuidado de evitar la contaminación cruzada por esta suspensión vírica, que se sabe que es positiva. También deben prepararse cultivos negativos. Se incuba a 37°C en una incubadora con un 5% de CO_2 .

O bien:

Inoculación de monocapas preformadas: para cada tejido, se inoculan 1,0–1,5 ml de suspensión de células (preparadas como en el paso (v)) en 6–8 tubos de Leighton con cubres u otros frascos o placas de cultivo celular apropiados. Se incuban a 37°C durante un mínimo de 4 horas y un máximo de 36 horas (hasta que se alcanza un 50-80% de confluencia). Luego se drena el medio, se inocula 0,2 ml de líquido sobrenadante (del paso iv), se incuban durante 1-2 horas a 37°C, con agitación suave una o dos veces para evitar que las células se sequen y mueran, se lava una vez con PBSM (PBS sin Ca/Mg) y se recubre con 1 ml de medio de crecimiento y se incuban a 37°C en una incubadora con un 5% de CO₂.

- vii) En los días 1, 2 y 3 post-inoculación, se lavan dos cultivos, junto con un cultivo control positivo y otro negativo, dos veces durante 5 minutos cada vez con BBS de Hanks, MEM de Hanks o PBS, y se fijan. Se pueden aplicar distintos métodos de fijación de las células, que se describen en el apartado B.2.1. La fijación celular se puede llevar a cabo con acetona al 100% (grado analítico) durante 5 minutos en el caso de los cultivos sobre superficies de vidrio. Se pueden utilizar otros protocolos de fijación (por ejemplo, fijación con calor a 80 °C durante al menos 4 horas o durante toda una noche).

- viii) Tras la fijación, se lleva a cabo una tinción con un conjugado directo o indirecto anti-VPPC, y su dilución de trabajo apropiada se prepara como se describe en el apartado B.1.2. Tras el lavado en PBS tres veces durante 5 minutos cada una, se montan los cultivos con los cubres en glicerol tamponado con carbonato/bicarbonato, a pH > 8,0, y se comprueba si presentan focos fluorescentes.

En lugar de tubos de Leighton, pueden utilizarse placas de 6 pocillos con cubreobjetos. Como alternativa, para el aislamiento del virus también pueden utilizarse cultivos realizados en placas de microtitulación de fondo plano o en placas M24. En tal caso, las placas se fijan y se tiñen como se describe más adelante para la prueba del anticuerpo neutralizante unido a peroxidasa (NPLA; apartado B.2.1).

- ix) Si se demuestra que la suspensión de amígdala al 2% es tóxica para las células, la prueba debe repetirse empleando una dilución más alta u otro órgano. El método en el que se utilizan monocapas preformadas (arriba) ayudará a evitar este problema.

1.1.2. Aislamiento del virus – Procedimiento analítico 2

La sangre total (tratada con heparina o EDTA) de cerdos clínicamente enfermos es una muestra adecuada para diagnosticar la PPC. Se puede utilizar la fracción leucocitaria u otros componentes, pero por razones de simplicidad, la sangre total es más práctica, y por lo tanto es la muestra de elección. El procedimiento es el siguiente:

- i) Se congela una muestra de sangre total a -20°C y se descongela en un baño de agua a 37°C para lisar las células.
- ii) Se inoculan 100–300 µl de sangre hemolizada en una monocapa de células PK-15 cultivadas hasta un 50–80% de confluencia* en una placa M24 o tubos Leighton con cubreobjetos, y se permite la adsorción durante 1–2 horas a 37°C con agitación suave una o dos veces para evitar que las células se sequen y mueran. Siempre deben prepararse duplicados los cultivos de cada muestra.
- iii) Se elimina el inóculo, se lava la monocapa una vez con BBS de Hanks o MEM de Hanks o PBSM, y se añade medio de cultivo nuevo.
- iv) Después de una incubación de 3–4 días a 37°C en una incubadora con un 5% de CO₂, las placas se lavan, se fijan y se tiñen, como se describe más adelante para NPLA, utilizando en cada paso un volumen de 300 µl para compensar la mayor superficie celular.

Nota: este método es menos sensible que el aislamiento convencional del virus (procedimiento analítico 1) para la detección de PPC aguda.

* La inoculación simultánea, aunque es ligeramente más sensible, es menos adecuada porque el anticoagulante puede interferir con la adherencia de las células a la superficie.

1.1.3. Aislamiento del virus – Procedimiento analítico 3

Para mejorar la sensibilidad, el aislamiento del virus se puede realizar en dos etapas:

- i) Se inocula un tubo de cultivo celular con 200–300 µl de preparación de órganos o de lisado de sangre (véase arriba). Siempre deben prepararse duplicados de los cultivos.
- ii) Se incuban los cultivos celulares a 37°C durante 1–2 horas, se agitan suavemente una o dos veces para evitar que las células se sequen y mueran, y se lavan dos veces con PBSM.
- iii) Se incuban los cultivos durante 72 horas a 37°C en una incubadora con un 5% de CO₂. El medio MEM de Eagle con un 5-10% de FBS es ideal para el cultivo del virus. Es posible una inoculación simultánea si la muestra es fresca y es improbable que aparezca un efecto citotóxico.
- iv) Se congelan los tubos o placas de cultivo celular a –80°C durante al menos 1 hora y a continuación se descongelan a temperatura ambiente.
- v) Cuando se utilizan tubos de cultivo celular, los tubos se centrifugan durante 10 minutos a 778 g.
- vi) Se incuban 200–300 µl del sobrenadante durante 1–2 horas en cultivos celulares en un pocillo de una placa multi-disco o en un tubo Leighton como se ha descrito anteriormente.
- vii) Se lavan los tubos o placas de cultivo celular con PBSM, se vuelven a llenar con medio de cultivo celular y se incuban durante 72–96 horas en una incubadora con un 5% de CO₂.
- viii) Las células se fijan y tiñen como se describe en el apartado B.2.1.

Si se sospecha de una cepa de crecimiento lento, puede realizarse un Segundo pase en un tubo de cultivo, que irá seguido de un tercer pase en un disco de cultivo.

Siempre deben incluirse controles positivos y negativos, y procesarse del mismo modo.

1.1.4. Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR)

Se han descrito muchos métodos de RT-PCR, y otros están en desarrollo (Ganges *et al.*, 2020; Postel *et al.*, 2018). Utilizando técnicas de RT-PCR, pueden detectarse animales infectados al principio del periodo de incubación, un periodo de infección persistente posterior y durante un periodo de tiempo más largo en los casos en que los cerdos se recuperan. La RT-PCR solo detecta ácido nucleico del virus y puede dar resultados positivos en casos en que el aislamiento del virus u otras técnicas han dado resultados negativos. Por lo tanto, la RT-PCR es más sensible que otras técnicas (como el ELISA de captura de antígeno o la FAT).

Debido a su rapidez y sensibilidad, la RT-PCR es adecuada para el cribado y la confirmación de casos sospechosos de enfermedad, y está aceptada por muchos países, incluida la Unión Europea (UE). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que pueden producirse falsos positivos debidos a una contaminación del laboratorio, así como falsos negativos debidos a posibles inhibidores de la PCR en la muestra. Así, pues, cualquier resultado positivo en un brote primario debe confirmarse siempre con otras pruebas, por ejemplo, el aislamiento del virus o una RT-PCR que tenga por objetivo una región genómica distinta, o una RT-PCR en tiempo real. Es obligatorio incluir un número suficiente de controles positivos y negativos en cada ejecución de la prueba; también es muy recomendable que se incluyan controles internos. Para más detalles sobre las técnicas de la PCR, véanse los capítulos 2.1.2 *Avances biotecnológicos en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas* y 2.2.3 *Desarrollo y optimización de ensayos de detección de ácidos nucleicos* para más detalles sobre las técnicas PCR.

Esta prueba se puede aplicar a muestras de sangre o de suero en EDTA, así como a órganos sólidos y a sobrenadantes de cultivo celular, y se ha utilizado con éxito en casos de brotes.

El aislamiento del ARN es un paso fundamental en el análisis mediante RT-PCR. La integridad del ARN está en riesgo máximo antes y después de la extracción. Así pues, debe plantearse detenidamente el tratar las muestras antes de extraer el ARN y de almacenar el ARN aislado, puesto que ello influirá en la calidad del ARN que se obtenga y en el resultado de la prueba. Se han descrito distintos métodos de aislamiento del ARN y existe una gran variedad de kits

comerciales para la extracción (incluidos sistemas de extracción robóticos). El aislamiento del ARN también debe validarse en el laboratorio.

Se han descrito varios protocolos tanto de RT-PCR convencional como de RT-PCR tiempo real (Hoffmann *et al.*, 2005; McGoldrick *et al.*, 1998; Paton *et al.*, 2000b; Risatti *et al.*, 2003; 2005) y puede conseguirse un protocolo adecuado en la bibliografía o en los Laboratorios de Referencia de la OIE para la PPC¹. La evaluación de los resultados de la RT-PCR se puede llevar a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa (RT-PCR estándar) o mediante técnicas en tiempo real, y esta segunda técnica aporta la importante ventaja de reducir el riesgo de contaminación en el laboratorio por productos de la PCR. Se han desarrollado otras RT-PCR para diferenciar entre virus naturales y virus vacunales con cepa C. Algunas pruebas se centran en la detección del virus vacunal y otras en la detección de una cepa natural del VPPC específica (Liu *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2008). Para que un protocolo de RT-PCR pueda utilizarse para el diagnóstico en un laboratorio determinado, debe validarse exhaustivamente en dicho laboratorio para comprobar que el método es adecuado para el propósito previsto. Cualquier protocolo de RT-PCR que se utilice debe demostrarse que es al menos igual de sensible que el aislamiento del virus. El protocolo de RT-qPCR en tiempo real descrito por Hoffmann *et al.* (2005) se utiliza mucho con las siguientes secuencias de cebadores: cebador directo CSF 100-F: 5'-ATG-CCC-AYA-GTA-GGA-CTA-GCA-3'; cebador inverso CSF 192-R ligeramente modificado: 5'-CTA-YTG-ACG-ACT-RTC-CTG-TAC-3'. La secuencia de la sonda CSF es 5'-FAM-TGG-CGA-GCT-CCC-TGG-GTG-GTC-TAA-GT-TAMRA-3' (o BHQ1-3'). Este método ha dado resultados coherentes en pruebas de comparación entre laboratorios realizadas a nivel internacional.

En principio, es posible combinar muestras, pero debe comprobarse que la sensibilidad es al menos igual de alta que la del aislamiento del virus utilizando muestras no combinadas. Antes de proceder a utilizar la combinación de muestras, debe validarse adecuadamente en cada laboratorio.

El control de calidad es un aspecto fundamental del diagnóstico por PCR, y resulta crucial prevenir la contaminación del laboratorio.

1.1.5. Epidemiología molecular y tipificación genética

La epidemiología molecular de la PPC se basa en la comparación de diferencias genéticas entre las cepas de virus aisladas. La amplificación del ARN del VPPC por RT-PCR y la secuenciación nucleotídica es el método más simple de obtener los datos de las secuencias para hacer estas comparaciones, así como para estudiar la evolución del virus, el rastreo epidemiológico del origen de las cepas víricas y para monitorizar la eficacia de la vacunación en cuanto a protección frente al virus. Varias regiones diferentes del genoma del VPPC pueden constituir la diana en los estudios epidemiológicos moleculares (Paton *et al.*, 2000a). Se han estudiado exhaustivamente dos regiones que proporcionan muchos datos de secuencia con los que se pueden comparar las nuevas cepas aisladas. Uno de estos segmentos se encuentra en la región 5' no traducida (5'NTR) del genoma (150 nucleótidos) y el otro en el gen de la glicoproteína mayor E2 (190 nucleótidos). En resumen, el método usado consiste en extraer el ARN vírico de muestras clínicas o cultivos celulares infectados por VPPC de bajo número de países, realizar una RT-PCR para amplificar una o dianas dentro de 5'NTR o del gen de E2, y luego determinar la secuencia nucleotídica de los productos y comparar con la información acumulada en las bases de datos. En el Laboratorio de Referencia de la OIE para la PPC (Alemania) (Postel *et al.*, 2016) se dispone de una base de datos de estas secuencias. El análisis de múltiples regiones para tipificar con precisión el CSFV y otras cepas de Pestivirus mediante este método se describió anteriormente (Becher *et al.*, 2003). Para discriminar entre las cepas aisladas de VPPC estrechamente relacionadas, el análisis de la región codificante E2 completa (1119 nucleótidos) demostró ser una estrategia útil (Postel *et al.*, 2012). Las cepas de VPPC aisladas de brotes primarios deben enviarse a un Laboratorio de Referencia de la OIE para que se realice una investigación epidemiológica molecular. Antes de proceder al envío, se deberá contactar con el laboratorio receptor y solicitar un permiso de importación. Es muy recomendable que se lleve a cabo una caracterización detallada de las cepas de los brotes primarios, incluida una determinación de las secuencias del genoma completo, por ejemplo, mediante secuenciación de alto rendimiento.

1 <https://www.woah.org/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>

1.2. Métodos inmunológicos

1.2.1. Prueba de la inmunofluorescencia

La prueba de la inmunofluorescencia (FAT) es una prueba rápida que puede utilizarse para detectar antígeno del VPPC en cortes, obtenidos mediante criostato, de amígdalas, bazo, riñón, ganglios linfáticos o las partes distales del íleon. Deben obtenerse tejidos de varios animales (febriles y/o enfermos) (Bouma *et al.*, 2001) y transportarse sin conservantes y refrigerados, pero no congelados. Los cortes, obtenidos mediante criostato, se tiñen directamente con inmunoglobulina anti-PPC conjugada a un marcador de fluorescencia, como el isotiocianato de fluoresceína (FITC), o indirectamente empleando un conjugado fluorescente secundario, y se examinan en un microscopio de fluorescencia. Durante la primera fase de la infección, el tejido amigdalino es el más adecuado, porque es el primero en resultar afectado por el virus independientemente de la vía de infección. En los casos subagudos y crónicos, el íleon a menudo es positivo y en ocasiones puede ser el único tejido que presente fluorescencia, las amígdalas también son una muestra adecuada en el caso de animales vivos.

Un resultado negativo por FAT no descarta por completo la infección por PPC. Cuando se mantiene la sospecha de PPC, se deben obtener más muestras o intentar la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) el aislamiento del virus en cultivo celular. En algunos casos, durante la fase terminal de la enfermedad, la presencia de anticuerpos neutralizantes puede enmascarar un resultado positivo.

Existe un riesgo relativamente alto de falsos positivos y negativos cuando la FAT se utiliza en los laboratorios que no están bastante familiarizados con el método. Por lo tanto, la FAT debe utilizarse solo en laboratorios que tengan experiencia en el uso de esta técnica y en aplicarla de forma rutinaria, y que hayan recibido formación en la interpretación de la fluorescencia.

a) Procedimiento analítico

Deben incluirse cortes control positivo y negativo en cada serie de muestras de órganos que se examine. En el marcaje indirecto, también debe incluirse un corte control infectado, que se trata sin la incubación del primer anticuerpo. Los cortes control pueden prepararse de antemano y guardarse tras una fijación en acetona durante 2–3 años a -70°C hasta su uso.

- i) Se corta un trozo de las amígdalas, bazo, riñón o íleon, de aproximadamente $1 \times 1 \times 0,5$ cm, y se monta con un compuesto criostático o con agua destilada sobre un soporte de criostato.
- ii) Se congela el trozo de órgano en el criostato. La temperatura de congelación debe estar ser de entre -15 y -20°C . La congelación rápida del tejido en n-heptano enfriado con nitrógeno líquido es ideal.
- iii) Se realizan cortes de un grosor menor de $4-8 \mu\text{m}$ y se montan en cubres libres de grasa. Es útil marcar estos cubres cortándoles una esquina y montarlos con esta esquina siempre en la misma posición (por ejemplo, arriba a la derecha).
- iv) Se preparan varios cubres para cada muestra de tejido.
- v) Se secan durante 20 minutos a temperatura ambiente.
- vi) Después de secarlos, los cortes montados se fijan con acetona (de grado analítico) durante 10 minutos a -20°C , o al aire durante 20 minutos a 37°C .
- vii) Los cortes se sumergen brevemente en una solución salina tamponada con fosfato (PBS), se elimina el exceso de líquido con papel absorbente y se colocan (con la esquina cortada arriba a la derecha) en un soporte para cámara de incubación húmeda.
- viii) Se distribuye la solución de trabajo de inmunoglobulina anti-PPC (dilución en PBS) por encima del corte y se incuba en una cámara cerrada y oscura durante 30 minutos a 37°C . A continuación, se comprueba que las soluciones de conjugado no se hayan evaporado y que los tejidos no se hayan secado. Si se requiere un segundo conjugado con FITC, se lava el corte cinco veces durante 2 minutos cada vez con PBS a temperatura ambiente, y luego se añade la dilución de trabajo del conjugado con FITC, incubándose como se ha descrito antes.

- ix) Los cortes se lavan cinco veces durante 2 minutos cada vez (o tres veces durante 5 minutos cada vez) con PBS a temperatura ambiente.
- x) Se sumerge el corte brevemente en agua bidestilada (disolvente).
- xi) Si es necesario, se aplica un colorante de contraste (Azul de Evans) durante 30 segundos.
- xii) Se elimina el líquido restante con papel absorbente y se monta el cubre con el tampón de montaje en un porta para microscopio (situando el corte entre el cubre y el porta).
- xiii) Se elimina el exceso del líquido de montaje con papel absorbente y se examinan los cortes para comprobar si presentan fluorescencia, utilizando un microscopio de luz UV.

Un corte positivo para PPC muestra células con fluorescencia brillante en el citoplasma de las células infectadas. En las amígdalas, la fluorescencia es particularmente evidente en el revestimiento epitelial de las criptas. En cortes de riñón, la fluorescencia es más abundante en los túbulos proximales y distales del córtex renal y en los conductos colectores de la médula. En el íleon, la fluorescencia es más destacada en las células epiteliales de las glándulas de Lieberkühn, mientras que en el bazo la reactividad es más difusa, con concentraciones de células linfoides en la vaina linfoide periarterial (PALS).

Se recomienda utilizar gamma-globulinas anti-VPPC preparadas a partir de anticuerpos policlonales contra el VPPC generados en cerdos libres de patógenos específicos. Ello garantiza que no pasen desapercibidos variantes menores del virus, pero tiene el inconveniente de que la prueba no distinguirá entre los antígenos de distintos pestivirus. Así, los cerdos infectados por otros pestivirus pueden dar un resultado positivo. Para diferenciar entre el VPPC y otros pestivirus, sobre todo en zonas libres de VPPC, deben examinarse duplicados de muestras que hayan dado un resultado positivo con la FAT, empleando anticuerpos monoclonales (MAb) que puedan distinguir entre el VPPC y otros pestivirus (sobre todo el virus de la diarrea vírica bovina [VDVB] y el virus de la enfermedad de la frontera [VEF]) (Apartado B.1.2.2). Como alternativa, para el diagnóstico confirmativo se deberán esperar los resultados de la RT-PCR (seguida de tipificación genética) o del aislamiento del virus en cultivo celular con posterior tipificación mediante MAb.

Las cepas vacunales de virus vivo modificado (MLV) se multiplican principalmente en los ganglios linfáticos regionales y en el epitelio de las criptas de las amígdalas. Los cerdos vacunados con cepas MLV pueden dar positivo en la FAT durante 2 semanas tras la vacunación (Ogawa *et al.*, 1973). La RT-PCR seguida de secuenciación de ácido nucleico del amplicón obtenido permite diferenciar entre cepas naturales y cepas vacunales del VPPC.

La dilución de trabajo de los conjugados (al menos 1/30) debe combinar un máximo de brillo con un mínimo de fondo. La prueba debe realizarse solo con muestras de animales recién muertos, dado que la autólisis y la contaminación bacteriana a menudo comportan una tinción de fondo alta.

1.2.2. Diferenciación de pestivirus mediante anticuerpos monoclonales por el procedimiento de la inmunoperoxidasa

La utilización de un conjunto de tres anticuerpos monoclonales (MAbs), conjugados con peroxidasa de rábano (HRPO) o con un marcador de fluorescencia, o usados junto con un conjugado anti-ratón y que sean capaces de detectar de modo específico todas las cepas naturales de VPPC, las cepas vacunales de VPPC y el VDVB, respectivamente, permitirían, por una parte, una diferenciación inequívoca entre las cepas de campo y las cepas vacunales del VPPC y, por otra, distinguir entre el VPPC y el VDVB (Edwards *et al.*, 1991). Un prerrequisito es que el MAb contra el VPPC reconozca todas las cepas naturales y que el MAb antivacunal reconozca todas las cepas vacunales empleadas en el país. *No hay ningún MAb que reaccione selectivamente con todos los demás pestivirus* (Edwards *et al.*, 1991). En áreas no vacunadas, se puede omitir el MAb para diferenciar la cepa vacunal. Como control positivo puede servir una inmunoglobulina policlonal anti-PPC conjugada a HRPO. Se debe proceder con cierta cautela cuando se utiliza un solo MAb como única confirmación de que una cepa corresponde a la PPC. La presencia de varios genotipos del VEF que pueden infectar a los cerdos en condiciones naturales y la detección de un número creciente de pestivirus de rumiantes adicionales pueden dificultar la diferenciación del VPPC de otros pestivirus mediante MAbs. Por lo tanto, para

diferenciar de forma fiable el VPPC de otros pestivirus se recomienda realizar la RT-PCR y, a continuación, la secuenciación de nucleótidos.

Deben incluirse cortes control positivo y negativo en cada serie de muestras de órganos que se examine. En el marcaje indirecto, también debe incluirse un corte control infectado, que se trata sin la incubación del primer anticuerpo. Los cortes control pueden prepararse de antemano y guardarse tras una fijación en acetona durante 2–3 años a –70°C hasta su uso.

a) Procedimiento analítico

- i) Se preparan ocho o más cortes (4–8 µm) de las amígdalas que son positivas por FAT, o de otro órgano positivo si no se dispone de amígdalas (como se describe arriba para la FAT).
- ii) Se colocan los cortes sobre cubreobjetos, se dejan secar durante 20 minutos a temperatura ambiente y se fijan en acetona (grado analítico) durante 10 minutos a –20°C y se dejan secar al aire.
- iii) Se preparan diluciones de trabajo de los respectivos MAb conjugados con peroxidasa en PBS + Tween al 0,01% + suero de caballo al 5%, pH 7,6. (Puede utilizarse MAb conjugado con FITC, así como MAb sin conjugar siempre que se emplee un conjugado secundario).
- iv) Se sumergen los cortes brevemente en PBS, se retira el exceso de líquido con papel absorbente y se colocan (con la esquina cortada arriba a la derecha) con soporte en una cámara de incubación húmeda.
- v) Se recubren dos cortes, cada uno con la dilución de trabajo del conjugado monoclonal respectivo, y otros dos cortes con la dilución de trabajo del conjugado policlonal (controles).
- vi) Se incuban en una cámara cerrada y oscura durante 30 minutos a 37°C. A continuación, se comprueba que las soluciones no se hayan evaporado y que los tejidos no se hayan secado.
- vii) Se lavan seis veces los cortes en PBS, durante 10 segundos cada vez y a temperatura ambiente.
- viii) Se tiñen los cortes con una solución recién preparada de cromógeno-sustrato* durante 5–15 minutos a temperatura ambiente.
- ix) Se lavan los cortes con acetato sódico 0,05 M, pH 5,0, en agua destilada y se montan en portaobjetos de microscopio.
- x) Se examinan los cortes en un microscopio de fondo claro. La tinción del citoplasma de un color rojo oscuro indica el reconocimiento de la cepa vírica por parte del conjugado respectivo, y se considera un resultado positivo.
- x) Interpretación de la prueba:

Anticuerpo policlonal	Anticuerpo monoclonal específico para			Interpretación
	Cepa PPC	Cepa PPC vacunal	Cepa de VDVB	
+	+	–	–	Cepa de campo de la PPC
+	+/-	+	–	Cepa vacunal de la PPC
+	–	–	+	Cepa de DVB/EF
+	–	–	–	Otros <i>Pestivirus</i> * distintos del de la PPC†

† Se debe tener siempre en cuenta la existencia de cepas nuevas de la PPC, y toda cepa aislada de casos en que se siga sospechando de PPC debe enviarse al Laboratorio de Referencia de la OIE.

* **Solución de cromógeno del sustrato**

- A. Solución base de cromógeno: 0,4% de 3-amino-9-etil carbazol; N, N-dimetil-formamida (1 ml). Cuidado, **compuesto TÓXICO**. Esas dos sustancias químicas son cancerígenas y producen irritación en los ojos, la piel y el aparato respiratorio
- B. Acetato sódico 0,05 M, pH 5,0; 19 ml (esterilizados por filtración con membrana).
- C. Solución base de sustrato (peróxido de hidrógeno al 30%).

Mantener las soluciones base A y C a 4°C en la oscuridad y la solución B a temperatura ambiente. La solución base A puede mantenerse a 4°C durante al menos 6 meses y la solución C 1 año. Inmediatamente antes de su uso, diluir 1 ml de la solución A en 19 ml de la solución B. Añadir después 10 µl de la solución base C. Mezclar bien y teñir los cortes.

1.2.3. Prueba de captura del antígeno

Para un diagnóstico rápido de PPC en cerdos vivos, se han desarrollado enzimoimmunoanálisis de captura del antígeno (ELISA) para el cribado de piaras que se sospecha que se han infectado recientemente. Estos ELISA son del tipo de doble anticuerpo en sándwich, que emplean anticuerpos monoclonales y/o policlonales contra varias proteínas víricas del suero, de la fracción leucocitaria de la sangre o de sangre total anticoagulada; además, existen algunos kits de análisis para analizar homogeneizados titulares clarificados o suero. La técnica es relativamente simple de realizar, no requiere instalaciones de cultivo de tejidos, se puede automatizar y se pueden conseguir los resultados en medio día. La desventaja es que es menos sensible que el aislamiento del virus, sobre todo en cerdos adultos y en casos leves o subclínicos, puede compensarse analizando todos los cerdos de la piara sospechosa con pirexia o signos clínicos de la enfermedad. No obstante, teniendo en cuenta la baja especificidad de estas pruebas, se recomiendan otras pruebas de detección del agente (es decir, aislamiento del virus, RT-PCR o FAT).

La prueba no es apropiada para el diagnóstico de la PPC en un solo animal, sino que solo debe utilizarse a nivel de piara.

En todo caso primario, los resultados positivos deben confirmarse mediante otra prueba (es decir, el aislamiento del virus, la RT-PCR o la FAT).

2. Pruebas serológicas

Debido al efecto inmunosupresor del VPCC, no se pueden detectar anticuerpos con certeza hasta al menos 21 días después de la infección. Las investigaciones serológicas dirigidas a detectar focos residuales de infección, especialmente en piaras de reproductores, pueden ser útiles en una fase terminal de erradicación de la PPC. Los títulos de anticuerpos proporcionan datos epidemiológicos valiosos y podrían ser útiles para determinar la vía de entrada del virus. La detección de anticuerpos se ha convertido en el método más importante de evaluación de la respuesta inmunitaria tras la vacunación contra la PPC, y puede ser un componente útil de un programa de vacunación.

Como la incidencia de la infección por pestivirus de rumiantes puede ser alta, sobre todo en animales reproductores, solo resultan útiles las pruebas que discriminen entre anticuerpos contra la PPC y contra la DVB/EF. La NV y el ELISA que utilizan MAb satisfacen los requisitos de sensibilidad, pero los resultados positivos deben confirmarse comparándolos con la VN.

Las pruebas de neutralización se realizan en cultivos celulares utilizando un método de virus constante/suero variable. Como el VPCC no es citopático, cualquier virus no neutralizado debe detectarse, tras su multiplicación, por un sistema indicador. La NPLA y la prueba de neutralización vírica con anticuerpo fluorescente (FAVN) son las técnicas más ampliamente utilizadas. Ambas pruebas se pueden llevar a cabo en placas de microtitulación. El sistema NPLA es actualmente el preferido, es fácil de leer y tiene la ventaja de que los resultados pueden determinarse mediante un microscopio de luz invertida.

2.1. Prueba del anticuerpo neutralizante unido a peroxidasa

La NPLA se realiza en placas de microtitulación de fondo plano. Para la inactivación del complemento y para bajar el riesgo de contaminación bacteriana, es recomendable incubar los sueros a 56 °C durante 30 minutos antes de utilizar la prueba de VN. A efectos del mercado internacional, es mejor analizar una dilución inicial de suero de 1/5 (dilución final de 1/10). Para los programas de seguimiento en un país, puede ser suficiente una dilución de cribado de 1/10 (dilución final de 1/20). En cada prueba deben incorporarse los controles apropiados para asegurar la especificidad y la sensibilidad de las reacciones.

2.1.1. Procedimiento analítico

- i) En dos pocillos de una placa de microtitulación se distribuyen 50 µl de diluciones de suero en medio de crecimiento (MEM de Eagle, suero fetal bovino al 5-10 % y antibióticos). El FBS debe estar libre de ambos pestivirus de los rumiantes y de anticuerpos contra el VDVB y otros pestivirus. Para cada muestra se debe incluir un tercer pocillo con suero y sin virus, a modo de suero control (para citotoxicidad y/o tinción inespecífica).

- ii) Se añaden a los pocillos 50 µl de suspensión vírica, diluida en un medio de crecimiento hasta contener aproximadamente 100 DICT₅₀ (dosis que resulta infectiva en el 50% del cultivo celular)/50 µl, y se mezcla el contenido en un agitador de placas de microtitulación durante 20 segundos. Un virus utilizado a menudo es el virus de la PCC Alfort 187 (genotipo 1.1.). Aunque solo hay un serotipo de VPPC, se recomienda mucho que también se utilicen los genotipos o las cepas víricas naturales que estén circulando en el país o en otros países relevantes, porque los títulos de anticuerpos pueden variar según el genotipo vírico que se utilice en la prueba. Las cepas vacunales también pueden utilizarse como virus recomendados, dadas las preocupaciones acerca de la seguridad durante las prácticas de laboratorio.
- iii) Se incuban las placas en una incubadora de cámara húmeda con CO₂ durante 1 hora a 37°C.
- iv) Se añaden a todos los pocillos 50 µl de medio de crecimiento con 2 × 10⁵ células PK-15/ml.
- v) Se realiza una titulación del virus por retroceso y se incuba junto con la placa de neutralización.
- vi) Se dejan crecer las células a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂ hasta la confluencia, normalmente unos 3–4 días.
- vii) Se elimina el medio de crecimiento y se lavan las placas una vez con NaCl 0,15 M o PBS.
- viii) Se drenan las placas dejándolas sobre papel absorbente.
- ix) Las monocapas celulares pueden fijarse por uno de los siguientes métodos:
 - a) Se incuban las placas 45 minutos a 37°C, y luego a –20°C durante al menos 45 minutos. Se sacan las placas del congelador, se llenan los pocillos con 100 µl de paraformaldehído al 4% en PBS y se vuelven a incubar a temperatura ambiente durante 5–10 minutos. Se elimina el paraformaldehído y las placas se lavan con NaCl 0,15M;
o
 - b) Se incuban las placas a 70–80°C durante 2–3 horas;
o
 - c) Se fijan las placas en acetona al 80% y se incuban a 70–80°C durante una hora;
o
 - d) Se fijan las placas en acetona al 20% en PBS durante 10 minutos seguidos de un secado total a 25–30°C durante 4 horas. (Esto se puede acelerar mediante la ayuda de un secador de pelo – se obtiene un secado completo después de 3–5 minutos – según se observa por el color blanquecino de la monocapa celular);
o
 - e) Se lavan las placas con etanol al 99,9% enfriado en hielo y se fijan con etanol al 99,9% durante 45 minutos a 4°C. (La tinción debe realizarse de inmediato).
 - x) Se añaden a cada pocillo (de una placa de 96 pocillos) 50 µl de un antisuero porcino hiperinmune contra la PPC o un MAb, diluido en NaCl 0,5 M que contenga Tween 80 al 1% + acida sódica al 0,1%, pH 7,6; se puede utilizar Tween 20 o Tween 80. Se incuban a 37°C durante al menos 15-30 minutos. La dilución de trabajo del antisuero debe determinarse mediante titulación previa: es decir, un suero con un título por NPLA de 1/30.000 puede utilizarse a 1/100.
- xi) Se lavan tres a cinco veces las placas con NaCl 0,15 M que contenga Tween al 1%, pH 7,6 o PBS que contenga Tween y una vez en agua destilada.
- xii) Se añaden a cada pocillo 50 µl de una solución de anticuerpos anti IgG porcina o murina (según convenga) conjugados a HRPO, diluidos a su dilución de trabajo con NaCl 0,5 M que contenga 1% de Tween, pH 7,6, y luego se incuban en la oscuridad durante al menos 15–30 minutos a 37°C.
- xiii) Se lavan las placas tres a cinco veces con NaCl 0,15 M que contenga Tween al 1%, pH 7,6.

- xiv) Se añaden 50 µl de solución de cromógeno-substrato a cada pocillo y se tiñe durante 15–30 minutos a temperatura ambiente. Esta solución se describe en el apartado B.1.2.2. “Diferenciación de pestivirus mediante anticuerpos monoclonales por el procedimiento de la inmunoperoxidasa”.
- xv) Se desecha el sobrenadante y se lava una vez con PBS/agua destilada a una proporción de 1/3.
- xvi) Se lee la prueba visualmente. Las capas celulares infectadas se tiñen total o parcialmente de color marrón rojizo por el citoplasma. Debe examinarse la monocapa por microscopía a baja resolución para determinar el punto final de la titulación. El citoplasma de las células infectadas se tiñe de rojo oscuro. Los títulos de neutralización se expresan como el recíproco de la dilución sérica más alta que previene el crecimiento del virus en el 50% de dos pocillos replicados. El título se puede calcular con la ecuación de Karber (1931).
- xvii) En la prueba se incluyen los siguientes controles: control de células, de suero positivo y de titulación del virus problema por retroceso. La dilución de virus que se añade a la placa de neutralización se somete a una titulación por retroceso, que debe cubrir un intervalo de 4 logaritmos de dilución. La titulación por retroceso, que actúa como control de calidad interno, debe confirmar que el virus se ha utilizado a una concentración de entre 30 y 300 DICT₅₀/50 µl. Debe incluirse un suero de referencia positivo para anticuerpos contra la PCC cuyo título se conozca. Si el suero de referencia no da el resultado esperado y la titulación por retroceso está fuera del límite, la prueba debe repetirse. Debe realizarse un seguimiento de los sueros de referencia a lo largo del tiempo empleando gráficos de la trazabilidad interna del laboratorio.
- xviii) El título de la titulación por retroceso se calcula empleando el método que describen Karber (1931).

Nota: Los tiempos de incubación proporcionados anteriormente son solo orientativos. Para conservar los reactivos, pueden utilizarse tiempos de incubación mayores con diluciones de reactivos adecuadas a dichos tiempos.

2.2. Prueba de neutralización vírica con anticuerpos fluorescentes

2.2.1. Método del tubo Leighton u otro método adecuado de frasco o placa para cultivo celular :

- i) Se siembra una suspensión de células PK-15 a una concentración de 2×10^5 células/ml en tubos Leighton con un cubre, u otros frascos o placas de cultivo celular adecuados.
- ii) Se incuban los cultivos 1–2 días a 37°C hasta que alcancen un 70–80% de confluencia.
- iii) Se inactiva el complemento en los sueros mediante incubación durante 30 minutos a 56°C. A efectos del mercado internacional, es mejor analizar una dilución inicial del suero de 1/5 (dilución final 1/10).
- iv) Se incuba durante 1–2 horas a 37°C el suero diluido con un volumen igual de una suspensión vírica que contenga 200 DICT₅₀ de VPPC durante 1–2 horas a 37°C; de esta forma se utiliza una cantidad constante de VPPC de 100 DICT₅₀ por cada pocillo de reacción.
- v) Se desecha el medio de los cultivos celulares, se cubre la capa celular con la mezcla de virus/suero (del paso iv) y se incuba durante 1 hora a 37°C en una atmósfera húmeda.
- vi) Se pone un volumen adecuado de medio de mantenimiento en los cultivos celulares durante 2-3 días más.
- vii) Se desecha el medio del cultivo celular, se lavan las monocapas dos veces durante 5 minutos cada una con PBS, pH 7,2, se fijan con acetona pura o paraformaldehído durante 30 minutos y se tiñen con la solución de trabajo del conjugado durante 30 minutos a 37°C antes de lavar.
- viii) Si se usan tubos Leighton, se montan los cubres en portas sin grasa con 90% de glicerol tamponado con carbonato/bicarbonato, pH > 8,0, y se examinan para comprobar si presentan fluorescencia. Si se usa un frasco o placa de cultivo celular, se pone un volumen adecuado de PBS ellos para impedir que las células se sequen en exceso antes del examen de la fluorescencia.

Cuando la prueba FAVN se realiza en placas de microtitulación, se puede seguir el procedimiento para la NPLA (apartado B.2.1.1) hasta el paso ix. Las placas se tiñen a continuación con la dilución de trabajo del conjugado durante 30 minutos a 37°C y se examinan para comprobar si presentan fluorescencia.

Nota: cuando se detecte la fluorescencia, las placas de microtitulación se examinan mejor desde arriba, utilizando una lente objetivo de longitud focal larga y un microscopio invertido.

2.3. Prueba comparativa de neutralización para discriminar entre la infección por el VPPC y la infección por otros pestivirus

Los sueros de cerdos infectados por el VDVB, el VEF u otros pestivirus pueden dar, por reacción cruzada, títulos de anticuerpos en la FAVN o la NPLA y producir falsos positivos como si los cerdos hubieran estado infectados por el VPPC. La intensidad de la reacción cruzada depende del pestivirus que esté implicado y del intervalo entre la infección y el momento del muestreo (Wensvoort *et al.*, 1989a). Son útiles las pruebas comparativas que utilizan una o más cepas de VPPC, una cepa de VDVB y al menos una cepa de VEF que sean representativas del país o de la región. Para confirmar los resultados positivos de las pruebas serológicas que no discriminan entre la infección por el VPPC u otros pestivirus, se utilizarán pruebas comparativas que utilicen una o más cepas del virus de la VPPC, una cepa del VDVB y al menos una cepa del VEF. Las pruebas comparativas se realizan según los protocolos descritos para FAVN o NPLA; las líneas celulares deben ser adecuadas para el VDVB y el DVB. Los títulos de neutralización se expresan como el recíproco de la dilución más alta de suero que evita el crecimiento celular en el 50% de dos pocillos duplicados. Una diferencia de tres veces o más entre los puntos finales de dos titulaciones (utilizando series de dilución a la mitad) debe considerarse decisiva para una infección por la especie de virus que da el título más alto. Para obtener un resultado definitivo, podría ser necesario utilizar diferentes cepas del mismo genotipo, y/o analizar varios cerdos de una piara afectada.

2.4. Enzimoanálisis

Se han desarrollado varias técnicas ELISA que se basan principalmente en dos formatos ELISA, competitivo o de bloqueo, y ELISA no competitivo (por ejemplo, ELISA indirecto, de doble antígeno). Los ensayos comerciales detectan principalmente anticuerpos contra la glicoproteína E2. Las muestras de suero o plasma procedentes de cerdos individuales se analizan mediante el ELISA. Se puede investigar un gran número de muestras en poco tiempo, lo que hace que estos ensayos sean adecuados para la vigilancia a nivel de la piara. Asimismo, las pruebas ELISA permiten vigilar la seropositividad posterior a la vacunación, aunque sólo en los países en los que el virus no circula y se sigue aplicando la vacunación. En general, la prueba ELISA debe ser lo suficientemente sensible como para puntuar cualquier muestra de suero positiva de animales convalecientes (es decir, al menos 21 días después de la inoculación) que sean positivos en la prueba de neutralización y debe demostrar una mínima reactividad cruzada con el VDVB, el VEF y otros pestivirus. El sistema analítico debe garantizar la identificación de todas las infecciones por el virus de la peste porcina clásica, independientemente del genotipo del mismo. Si el procedimiento ELISA no es específico para la peste porcina clásica, las muestras positivas deberán examinarse más a fondo mediante pruebas diferenciales para distinguir entre el virus de la peste porcina clásica y otros pestivirus.

2.4.1. Antígeno

El antígeno debe derivar de proteínas víricas de una de las cepas recomendadas de VPPC, o corresponder a dichas proteínas. Las células utilizadas para preparar antígeno deben estar libres de cualquier otra infección por *Pestivirus*.

2.4.2. Antisueros

Los antisueros policlonales para pruebas de competición o de bloqueo deben obtenerse de cerdos o conejos infectados por una de las cepas recomendadas de VPPC o por la cepa C adaptada a conejo. Los MAb deben ir dirigidos contra una proteína vírica inmunodominante del VPPC. Preferiblemente deben utilizarse MAb. Las pruebas indirectas deben utilizar un reactivo anti-inmunoglobulina porcina que detecte tanto IgG como IgM.

El uso de vacunas marcadoras depende de una prueba discriminatoria capaz de distinguir entre animales vacunados e infectados de manera natural. Junto con la vacuna de la subunidad E2, pueden utilizarse como pruebas discriminatorias otras vacunas marcadoras que inducen anticuerpos específicos contra la E2 del VPPC en ausencia de una respuesta inmunitaria específica contra la E^{rns} del

VPPC, un ELISA que detecte los anticuerpos específicos contra la E^{ns} del VPPC. No obstante, los ELISA específicos de E^{ns} que se venden son menos sensibles y específicos que los ELISA convencionales de detección de anticuerpos contra la E2 del VPPC. Se recomienda utilizar las pruebas discriminatorias a nivel de rebaño y no para el diagnóstico de animales sueltos (Comisión Europea, 2003; Meyer *et al.*, 2017; Pannhorst *et al.*, 2015).

Para más información sobre los kits comerciales de diagnóstico, consúltense los Laboratorios de Referencia de la OIE. Aunque estos kits se han validado exhaustivamente antes de ser autorizados, antes de proceder a su uso cada laboratorio debe realizar un control del lote con sueros de referencia escogidos (positivos y negativos). Esto también debe aplicarse respecto al uso de ELISA internos.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

1. Antecedentes

La PPC tiene acarrea graves consecuencias clínicas y socio-económicas para la producción porcina en todo el mundo. El control de la enfermedad suele ser responsabilidad nacional, y en muchos países la vacunación forma parte de un programa nacional de control auspiciado por las autoridades veterinarias.

Las directrices para la producción de vacunas veterinarias se indican en el Capítulo 1.1.8 *Principios de producción de vacunas veterinarias*. Las directrices dadas aquí y en el capítulo 1.1.8 son de naturaleza general y puede complementarse con requisitos nacionales y regionales. Por otra parte, en función de cada país o región, para obtener una autorización o licencia para una vacuna veterinaria los fabricantes deberán aplicar distintos requisitos más relativos a la calidad, la seguridad y la eficacia.

Siempre que se manipule el VPPC, deben aplicarse los correspondientes procedimientos de bioseguridad. Las instalaciones de producción de vacuna contra la PPC deben cumplir los requisitos de contención que se describen en 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*.

La vacuna óptima contra la PPC debe tener las siguientes características: seguridad a corto y largo plazo en especies de destino y no de destino (sobre todo en el caso de las vacunas orales), estabilidad, inducción rápida de una inmunidad estable, preferiblemente de por vida, efectividad contra todas las cepas y genotipos de los virus naturales, protección clínica completa y protección contra los estados de portador, y prevención de la transmisión horizontal y de la transmisión vertical. Asimismo, las vacunas marcadoras tendrán que ir acompañadas de pruebas discriminatorias fiables. La fabricación deberá garantizar una constancia de la producción y validación.

Las vacunas vivas modificadas (MLV) que contienen varias cepas víricas atenuadas (como la cepa C, Thiverval, PAV-250, GPE-, o la cepa K) son las más utilizadas, y en muchas de ellas se debe demostrar que son tanto seguras como eficaces. Además, existen vacunas de subunidad E2 producidas en sistemas de baculovirus u otros. Actualmente no se dispone de vacunas de virus entero inactivado.

La información sobre estas vacunas se puede encontrar en publicaciones de revisión (Blome *et al.*, 2017b; Ganges *et al.*, 2020; Postel *et al.*, 2018).

Las primeras vacunas contra la PPC marcadoras contenían la glucoproteína E2 del VPPC recombinante expresada en células de insectos. Los cerdos vacunados con estas vacunas de subunidades no generan anticuerpos contra otras proteínas del VPPC (por ejemplo, E^{ns}), lo cual permite diferenciar de manera fiable entre animales vacunados y animales infectados (DIVA). No obstante, en comparación con los animales vacunados con vacunas vivas, dos de las principales desventajas de estas vacunas de subunidades fueron un retraso considerable del inicio de la inmunidad y la necesidad de aplicar dos inoculaciones. Aunque una administración única de la vacuna de la subunidad E2 permitía prevenir los signos clínicos y la mortalidad, además de reducir la transmisión tras la exposición a la infección (Bouma *et al.*, 1999; 2000), no prevenía la transmisión transplacentaria.

También se están desarrollando generaciones nuevas de vacunas marcadoras y la Agencia Europea del Medicamento (EMA) ha otorgado aprobación para el registro de un pestivirus quimérico que engloba la E2 del VPPC en la estructura del pestivirus de rumiante, y se ha autorizado también para su uso en un banco de vacunas de EE.UU. Esta vacuna, denominada CP7_E2alf, posee muchas de las características de una vacuna óptima, como las siguientes: estabilidad genética; inocuidad en especies de destino y no de destino; ausencia de transmisión del virus vacunal a animales que contacten con los vacunados o a través de la expulsión por la orina, las heces o el

esperma; inicio rápido de la protección tras una única inyección intramuscular; una duración de la inmunidad de al menos 6 meses; y protección contra distintos genotipos del VPPC (Blome *et al.*, 2017a). La capacidad de prevención de la transmisión transplacentaria de la vacuna CP7_E2alf tras una única dosis se ha demostrado en cerdas gestantes para una cepa del VPPC moderadamente virulenta (Henke *et al.*, 2018). La protección frente a la transmisión transplacentaria cepas altamente virulentas del VPPC todavía no se ha evaluado.

Existen distintas estrategias DIVA mediante métodos serológicos (como el ELISA) o métodos de detección de genoma (como la RT-PCR). Una opinión publicada por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2008) puso de manifiesto que puede emplearse con éxito la combinación de una vacuna con cepa C y la RT-PCR para detectar el genoma vírico en animales sacrificados en una estrategia de vacunación sin sacrificio (Zhao *et al.*, 2008). Véase también el apartado B.1.1.4 de este capítulo.

En el caso de la vacuna quimérica CP7_E2alf, aprobada recientemente, el uso de una estructura de pestivirus de rumiante permite diferenciación serológica mediante el empleo de técnicas E^{ms}-ELISA para el VPPC. No obstante, la evaluación de estas dos pruebas para determinar si permiten una estrategia DIVA reveló que la especificidad de la prueba podría resultar comprometida en los casos de infección por pestivirus de ruminantes, una situación que daría lugar a inducción de anticuerpos de reactividad cruzada (Meyer *et al.*, 2017; 2018; Pannhorst *et al.*, 2015).

Por lo tanto, todavía se pueden lograr mejoras respecto a las vacunas marcadoras y a sus pruebas de diagnóstico acompañantes. Recientemente se han publicado revisiones sobre los últimos avances en cuanto a las vacunas contra el VPPC candidatas por Blome *et al.*, 2017b y Ganges *et al.*, 2020.

Las vacunas contra la PPC se utilizan en distintos contextos y situaciones epidemiológicas. La mayoría de países libres de la enfermedad han adoptado una estrategia de control sin vacunación profiláctica, pero han establecido disposiciones legales para los casos de emergencia. En situaciones endémicas, la vacuna se utiliza principalmente para disminuir el efecto de la enfermedad o como primer paso de un programa de erradicación. Durante incidentes epidémicos en zonas que hasta entonces habían estado libres de la enfermedad, la vacunación sin sacrificio puede ser una herramienta adicional para controlar y erradicar la enfermedad y las vacunas que permiten una estrategia DIVA resultan prometedoras como herramienta adicional en este contexto.

Además, puede considerarse la posibilidad de la vacunación por vía oral de poblaciones de jabalíes afectados. Estos distintos escenarios y los distintos sistemas de producción porcina pueden requerir vacunas de distintas características o influir en los requisitos principales.

2. Descripción de la producción y requisitos mínimos para las vacunas vivas

2.1. Características del inóculo

Las vacunas contra la PPC que se preparan en animales vivos no siguen los principios de la OIE sobre bienestar animal y deben dejar de producirse.

2.1.1. Características biológicas del inóculo primario

Los MLV se producen a partir de cepas del VPPC que han sido atenuadas por pases en cultivo celular o en una especie hospedadora adecuada no perteneciente a la familia Suidae. La producción se lleva a cabo en cultivos celulares, en base a un sistema de lotes de inóculo.

Los virus del inóculo primario (MSV) que se convertirán en MLV deben escogerse y producirse en función de su facilidad de crecimiento en el cultivo celular, de la cantidad de virus que produzcan y de su estabilidad.

La procedencia exacta de la cepa aislada de VPPC subyacente, su secuencia y el historial de pases deben registrarse.

2.1.2. Criterios de calidad

Solo los MSV que hayan sido establecidos como estériles, puros (libres de agentes extraños según se describe en el Capítulo 1.1.9 *Pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación en los materiales biológicos de uso veterinario* y los que indiquen las autoridades que otorgan la licencia) e inmunógenos pueden utilizarse para producir virus vacunal (virus de inóculo de trabajo y lotes de vacuna). Debe comprobarse que las vacunas vivas no causen enfermedad ni otros

efectos adversos en las especies de destino a las que se inyecten, de acuerdo con el capítulo 1.1.8 (apartado sobre *Pruebas de seguridad* [para MSV atenuados vivos]).

La identidad del MSV debe confirmarse con los métodos adecuados (por ejemplo, utilizando MAb específicos o métodos de detección del genoma específico de la cepa vacunal).

2.1.3. Validación como cepa vacunal

Debe comprobarse que la vacuna derivada del MSV sea satisfactoria en cuanto a la seguridad y la eficacia.

Incluso cuando se desconoce si los cerdos son susceptibles a agentes causantes de encefalopatías espongiformes transmisibles (EET), debe minimizarse el riesgo de transmisión garantizando que no se utilizan materiales con riesgo de TSE como fuente de virus ni en ninguno de los medios que se empleen para propagar el virus.

El virus vacunal del producto final en general no debe haber sido sometido a más de cinco pases desde el lote del inóculo primario. La vacuna comercial debe producirse en lotes en forma liofilizada como producto homogéneo.

2.2. Método de fabricación

2.2.1. Procedimiento

El virus se utiliza para infectar una línea celular estabilizada. Debe comprobarse que este cultivo celular esté libre de microorganismos contaminantes y que cumple con los requisitos del capítulo 1.1.8.

Independientemente del método de producción, el sustrato debe recolectarse en condiciones asépticas y puede someterse a métodos adecuados para liberar el virus asociado a células (por ejemplo, ciclos de congelación-descongelación). El material recolectado puede volver a procesarse por filtración y otros métodos. Puede añadirse un estabilizador según necesidad. La vacuna se homogeneiza antes de la liofilización para garantizar un lote/serie uniforme.

2.2.2. Requisitos para los ingredientes

Todos los ingredientes utilizados para la producción de vacuna deben cumplir los requisitos del capítulo 1.1.8.

2.2.3. Controles durante el proceso

Los controles durante el proceso dependerán del protocolo de producción: incluyen la titulación del virus en el antígeno a granel y pruebas de esterilidad.

2.2.4. Pruebas en lotes/series de producto final

i) Esterilidad

Las pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación en los materiales biológicos de uso veterinario se indican en el capítulo 1.1.9.

ii) Identidad

Deben utilizarse los métodos adecuados (métodos de detección de anticuerpos específicos o de detección de genoma específico) para confirmar la identidad del virus vacunal.

iii) Humedad residual

El nivel de humedad que contengan los productos desecados debe medirse como se describe en el Capítulo 1.1.8.

iv) Seguridad

Se realizan pruebas de seguridad del lote a no ser que se demuestre una seguridad constante en el producto y que esté aprobada en el dossier de registro, y que también esté aprobada la constancia del proceso de producción respecto a los requisitos estándar indicados en el capítulo 1.1.8.

Esta prueba de seguridad en el lote de producto final se lleva a cabo para detectar posibles reacciones adversas anómalas locales o sistémicas.

En el caso de las pruebas de seguridad en lotes/series, se utilizan dos lechones sanos, de 6-10 semanas de edad, que no tengan anticuerpos contra pestivirus. Se administran a cada lechón, por la vía recomendada, diez dosis de la vacuna. Se observan a diario durante al menos 14 días. La vacuna supera la prueba si ninguno de los lechones presenta signos destacables de enfermedad ni muere por causas atribuibles a la vacuna.

v) Potencia del lote/serie

La titulación del virus es un indicador fiable de la potencia de una vacuna una vez se ha establecido una relación entre el nivel de protección que confiere la vacuna en los cerdos y el título de la vacuna viva modificada *in vitro*.

En ausencia de una correlación demostrada entre el título vírico y la protección, será necesario realizar una prueba de eficacia (véase el apartado C.2.3.3).

2.3. Requisitos para la autorización/registro/licencia

2.3.1. Proceso de fabricación

Para aprobar para el registro una vacuna, deben presentarse a las autoridades todos los datos sobre la preparación del MSV, la fabricación de la vacuna y las pruebas de control de calidad (véanse los apartados C.2.1 y C.2.2). Esta información corresponderá a tres lotes consecutivos de la vacuna procedentes del mismo MSV, con un volumen no inferior a 1/3 del volumen habitual de un lote industrial.

Los controles durante el proceso forman parte del proceso de fabricación.

2.3.2. Requisitos de seguridad

Para conseguir la aprobación de las autoridades reguladoras, deben superarse las siguientes pruebas de seguridad.

En las vacunas deben realizarse pruebas de los posibles efectos patógenos que tengan en los cerdos sanos, y debe comprobarse la seguridad en cerdas gestantes y en su descendencia.

i) Seguridad en animales de corta edad

Se lleva a cabo la prueba para cada vía recomendada de aplicación, utilizando en cada caso lechones que no superen la edad mínima recomendada para la vacunación. Se utiliza virus vacunal al mínimo nivel de pases atenuados que tenga en un lote de la vacuna.

Se utilizan no menos de 8 lechones de 6–8 semanas de edad que no tengan anticuerpos contra pestivirus. Se administra a cada lechón una cantidad del virus vacunal equivalente a no menos de diez veces el título vírico máximo que puede contener 1 dosis de la vacuna. Se observan los lechones a diario durante al menos 14 días. La temperatura corporal de cada lechón vacunado se toma durante al menos 3 días antes de administrar la vacuna, en el momento de la administración, 4 horas después y, a continuación, a diario durante al menos 14 días. La vacuna supera la prueba si el aumento medio de la temperatura corporal entre todos los lechones no supera los 1,5°C, si ningún lechón presenta un aumento de temperatura superior a 1,5°C durante un periodo superior a 3 días consecutivos, y si ninguno presenta signos destacables de enfermedad o muere por causas atribuibles a la vacuna.

Se toman muestras de sangre 7 días después de la vacunación y se analizan para comprobar si presentan leucopenia. El recuento leucocitario medio debe superar las 7×10^6 células/ml.

Además, debe comprobarse si las vacunas, en su presentación comercial, son seguras en condiciones de campo (véase el capítulo 1.1.8, apartado sobre *Pruebas de campo [seguridad y eficacia]*).

ii) Prueba de seguridad en cerdas gestantes y prueba de transmisión transplacentaria

La prueba se lleva a cabo con una vacunación por una vía recomendada empleando no menos de ocho cerdas reproductoras multíparas o primíparas sanas de la misma edad y origen, que se encuentren entre los días 55 y 70 de gestación, y que no tengan anticuerpos contra pestivirus. Se utiliza un virus vacunal que se encuentre al mínimo nivel de pases atenuados que habrá en un lote de la vacuna.

Se administra a cada reproductora una cantidad del virus vacunal equivalente a no menos del título vírico máximo que puede haber en 1 dosis de la vacuna. Los animales se observan a diario hasta el día del parto para registrar los posibles signos clínicos. Deben tomarse muestras de sangre de lechones neonatos antes de que ingieran calostro.

La prueba se invalida si la reproductora vacunada no seroconvierte antes del parto. El virus vacunal supera la prueba si no se observan anomalías en la gestación ni en los lechones, y si ninguna reproductora presenta signos destacables de enfermedad ni muere por causas atribuibles a la vacuna.

En las muestras de sangre de los lechones neonatos no debe haber virus vacunal ni anticuerpos contra el VPPC.

iii) Ausencia de transmisibilidad

Se mantienen juntos para la prueba no menos de 12 lechones sanos de 6–10 semanas de edad y del mismo origen, que no tengan anticuerpos contra pestivirus. Se utiliza virus vacunal al mínimo nivel de pases atenuados que habrá entre el lote de inóculo primario y un lote de la vacuna. Se administra por una vía recomendada a no menos de seis lechones a una cantidad del virus vacunal equivalente a no menos del título vírico máximo que puede haber en 1 dosis de la vacuna.

Se mantienen no menos de seis lechones como controles de contacto. La mezcla de lechones vacunados y lechones de contacto se realiza 24 horas después de la vacunación.

Pasados 45 días, se sacrifican todos los lechones por medios humanitarios. Se realizan en los lechones pruebas apropiadas de detección de anticuerpos contra el VPPC y en los lechones control pruebas de detección del VPPC en las amígdalas. La vacuna supera la prueba si se hallan anticuerpos en todos los lechones vacunados y si no se hallan ni anticuerpos ni virus en los lechones control.

iv) Reversión a la virulencia

La prueba de aumento de la virulencia consiste en administrar el virus vacunal procedente directamente del lote de inóculo primario, o bien que se encuentre uno o dos pases más allá, a lechones que no tengan anticuerpos contra pestivirus.

Este protocolo se repite cinco veces. Se administran a dos lechones sanos libres de anticuerpos contra pestivirus, y de 6–10 semanas de edad, por la vía recomendada, una cantidad del virus equivalente a no menos del título vírico máximo que contendrá 1 dosis de la vacuna. Se extrae una cantidad adecuada de sangre de cada lechón a diario entre los días 2 y 7 tras la administración del virus vacunal, y se combinan las muestras tomadas en el mismo día. A continuación, los lechones se sacrifican y se extraen las amígdalas de ambos, se combinan y se prepara una suspensión al 10% en PBS, pH 7,2, que se mantiene a 4°C o a -70°C si el almacenamiento va a ser prolongado. Al mismo tiempo, se confirma la presencia de antígenos contra la PPC en cada pase. Se utiliza sangre y tejido amigdalino de muestras

combinadas para inocular dos cerdos más de la misma edad y origen, y por la misma vía que antes.

Se administran 2 ml del material combinado (sangre y tejido amigdalino) con el título vírico máximo por una vía recomendada a otros dos lechones de la misma edad y procedencia. Si no se halla virus, se repite la administración una vez más con el mismo material y otros dos lechones. Si no se halla virus en este punto, el proceso termina aquí. No obstante, si se halla virus, se lleva a cabo una segunda serie de pases administrando 2 ml de material positivo por una vía recomendada a otros dos lechones de la misma edad y procedencia.

Se lleva a cabo esta operación de pase al menos cuatro veces (en total deben vacunarse cinco grupos desde el inicio de la prueba), verificando la presencia del virus en cada pase en sangre y amígdalas. Es necesario tener cuidado de evitar la contaminación por virus de pases previos.

El virus vacunal supera la prueba si no se observa aumento de la virulencia (se controla mediante observaciones clínicas) en el virus al máximo número de pases en comparación con el virus con el que no se han realizado pases.

Si no se recupera virus en ningún nivel de pases en la primera y segunda serie de pases, el virus vacunal también supera la prueba.

2.3.3. Requisitos de eficacia

i) Dosis protectora

La eficacia de la vacuna se estima directamente en animales vacunados, evaluando su resistencia a la exposición al virus, y se expresa por el número de dosis protectoras del 50% (PD₅₀) en cerdos que se encuentran en la dosis vacunal.

La prueba consiste en ensayo de vacunación/exposición en lechones de 6–10 semanas de edad, utilizando distintas diluciones de la vacuna en cuestión y cinco lechones por dilución. Se utilizan como controles un grupo adicional de dos lechones de la misma edad y procedencia. Todos los animales deben estar libres de anticuerpos contra pestivirus al empezar el estudio. Cada grupo de lechones, excepto el grupo control, se vacuna con una dilución apropiada de la vacuna reconstituida (por ejemplo, 1/40 y 1/60) empleando una solución tampón adecuada.

Un total de 14 días tras la inyección única de vacuna, se expone a los lechones, por una vía adecuada, a una dosis de una cepa virulenta del VPPC que mate como mínimo a un 50% de los lechones no vacunados en menos de 21 días. Se observa a los lechones durante 21 días y se registra su temperatura corporal 3 días antes de la exposición y a diario tras la exposición de 21 días. El contenido en PD₅₀ de la vacuna se calcula a partir del número de animales protegidos de cada grupo empleando el método de Spearman-Kärber.

La prueba se invalida si menos de un 50% de los lechones control presenta signos característicos de infección grave por el VPPC, y mueren, y si menos del 100% de los lechones control presenta signos clínicos de la enfermedad en el plazo de los 21 días siguientes a la exposición.

La vacuna supera la prueba si la dosis mínima corresponde a no menos de 100 PD₅₀.

Además, la protección contra la replicación del virus conferida por la vacuna debe evaluarse en la sangre y los tejidos de los animales vacunados utilizando los protocolos descritos anteriormente en las secciones B.1.1.3 y B.1.1.4.

ii) Protección contra la infección transplacentaria

Se utilizan ocho cerdas reproductoras que no tengan anticuerpos contra pestivirus, y se asignan aleatoriamente al grupo que se vacunará ($n=6$) o al grupo control ($n=2$).

Entre los días 34 y 49 de gestación, todas las reproductoras asignadas al grupo de la vacuna se vacunan una vez con 1 dosis de vacuna que contenga no menos del título mínimo indicado en la ficha técnica. Tres semanas después de la vacunación, las ocho reproductoras se exponen, por una vía adecuada, a una dosis de cepa virulenta del VPPC que sería suficiente para matar al menos al 50% de los lechones no vacunados en menos de 21 días.

Justo antes del parto, las reproductoras se sacrifican por medios humanitarios y sus fetos se examinan para comprobar si presentan el VPPC. Se analizan muestras de suero de las reproductoras y los fetos para comprobar si presentan anticuerpos contra el VPPC. El aislamiento del VPPC se lleva a cabo a partir de sangre de las cerdas (obtenida 7 y 9 días después de la exposición, y en el momento del sacrificio) y de órganos homogenizados (amígdalas, bazo, riñones, ganglios linfáticos) de los fetos.

La RT-PCR en tiempo real se puede llevar a cabo siguiendo la metodología descrita en el apartado B.1.1.4., aunque siempre en correlación con la prueba de aislamiento del virus. La prueba es válida si se halla virus en al menos un 50% de los fetos de las reproductoras control (excluyendo los fetos momificados).

La vacuna supera la prueba si no se halla virus en la sangre de las reproductoras vacunadas ni en sus fetos, y no se hallan anticuerpos contra el VPPC en el suero de los fetos de las cerdas vacunadas.

Además, cuando sea apropiado, deben realizarse pruebas de eficacia de la vacuna en condiciones de campo (véase el capítulo 1.1.8, apartado *Pruebas de campo [seguridad y eficacia]*).

2.3.4. Duración de la inmunidad

Independientemente del procedimiento de autorización, el fabricante debe demostrar la duración de la inmunidad de una vacuna dada, mediante la exposición o bien con una prueba alternativa validada, al final del periodo de validez indicado.

A un mínimo de diez cerdos vacunados se inocula una cantidad de virus que corresponda a 10^5 PID₅₀ (mediana de dosis infecciosa en el cerdo) de una cepa virulenta del VPPC y se observan durante 3 semanas. Los animales vacunados deben permanecer sanos; solo los controles deben morir.

La duración de la inmunidad tras la vacunación contra la PPC no debe ser inferior a 6 meses.

2.3.5. Estabilidad

Como parte de los estudios de determinación del periodo de validez, para la autorización de cualquier vacuna es necesario demostrar su estabilidad. Debe demostrarse que el periodo de validez de una vacuna liofilizada contra la PPC es como mínimo de 1 año.

3. Requisitos para otras vacunas

3.1. Vacuna oral

3.1.1. Antecedentes

El concepto más ampliamente aplicado de vacuna contra la PPC con cebo oral para el jabalí salvaje, incluido el diseño del cebo y el plan de vacunación, fue desarrollado, evaluado y optimizado por Kaden *et al.* (2010). Las respectivas vacunas son MLV convencionales. La inmunización tiene lugar por captación de la vacuna oral a través de los tejidos linfoides de la mucosa oral y de las amígdalas, donde la expresión del virus estimula el sistema inmunitario (Kaden *et al.*, 2000; 2010).

La seguridad tiene una importancia crucial en las vacunas orales, no solo para las especies de destino, sino también para el medio ambiente (véase el capítulo 1.1.8) y otras especies que puedan entrar en contacto con la vacuna.

3.1.2. Descripción de la producción y requisitos mínimos para las vacunas

Además del perfil de producción descrito anteriormente para vacunas inyectables, deben cumplirse los siguientes requisitos específicos:

i) Método de fabricación

a) Pruebas en lotes/series de producto final

Tras combinar todos los ingredientes, la mezcla final contiene la formulación definitiva que suele utilizarse en forma líquida. El último paso de la producción de un lote/serie es introducir la mezcla final en blísteres/cápsulas que se introducirán, a su vez, en cebos, o bien llenar directamente los cebos. Este lote/serie final se analiza como se ha descrito para las vacunas inyectables, con las siguientes diferencias:

- Prueba de humedad residual

La prueba de la humedad residual no es aplicable si la vacuna oral se presenta en forma líquida.

- Seguridad

Se administra por vía oral con jeringa a cada lechón un volumen correspondiente a diez dosis orales, según indique el fabricante.

ii) Requisitos para la autorización/registro/licencia

Además de los requisitos descritos para las vacunas inyectables, deben cumplirse los siguientes requisitos específicos.

a) El cebo

El cebo forma parte integral del producto y teóricamente debe cumplir los siguientes criterios:

- Estar diseñado para atraer y atraer las especies de destino y adaptarse al modo de distribución;
- mantener su forma y estado en gran variedad de temperaturas y condiciones climáticas;
- estar formado por ingredientes no dañinos, cumplir con las normas de alimentación animal y no interferir con la actividad vacunal;
- presentarse en un sistema que incluya una advertencia para el ser humano y que identifique el producto.

b) Requisitos de seguridad

En todas estas pruebas la vacuna líquida se administra por vía oral con una jeringa (no en la formulación final en cebo) para garantizar que todos los animales reciben la dosis completa.

- Precauciones

La liberación de vacunas orales al medio deberá cumplir con los requisitos indicados en el capítulo 1.1.8.

c) Requisitos de eficacia

Debe demostrarse la eficacia utilizando la vacuna líquida administrada con jeringa para garantizar que todos los animales reciben la dosis completa. Deben proporcionarse estudios de viabilidad de la formulación final (vacuna integrada en el cebo).

3.2. Vacunas basadas en la glicoproteína E2 recombinante

3.2.1. Antecedentes

Como se describe en la Directriz 3.3 Apartado E, las vacunas convencionales con virus vivo atenuado de la PPC dan lugar a un inicio rápido de la inmunidad y son efectivas para prevenir la transmisión de la infección (Ganges *et al.*, 2020; Postel *et al.*, 2018), pero tienen el inconveniente de que, utilizando métodos serológicos (como el ELISA), no se puede diferenciar entre cerdos infectados y cerdos que meramente han sido vacunados. Las vacunas de subunidad E2 que se comercializan (vacuna marcadora) tardan más en generar inmunidad y reducen la excreción del virus, aunque tal vez no la prevengan del todo, y la infección transplacentaria. No obstante, estas vacunas permiten una estrategia DIVA, lo cual facilita la aplicación de una estrategia de “vacunación sin sacrificio”.

La vacuna solo desencadena anticuerpos contra la glucoproteína E2 y, por lo tanto, pueden utilizarse anticuerpos contra otros antígenos del VPPC, como el antígeno E^{RNS}, como marcadores de infección. Se han desarrollado nuevas formulaciones basadas en E2, con eficacia mejorada y/o producidas en sistemas de expresión no basados en baculovirus (Suárez *et al.*, 2017), o están siendo desarrolladas (Blome *et al.*, 2017b; Gong *et al.*, 2019; Ganges *et al.*, 2020).

3.2.2. Descripción de la producción

i) Características del inóculo

La vacuna marcadora de subunidad E2 se prepara utilizando *Baculovirus* que exprese el antígeno E2 del VPPC. Por lo tanto, esta vacuna no contiene ningún VPPC, mientras que el baculovirus (vector) se inactiva químicamente.

a) Características biológicas del inóculo primario

La producción se lleva a cabo en cultivos celulares de insecto, basados en un sistema de lotes de inóculo.

Teóricamente, los MSV se escogen en función de su facilidad de crecimiento en el cultivo celular, la producción de virus y la estabilidad.

La procedencia exacta de la cepa, además de su secuencia e historial de pases, deben registrarse.

b) Criterios de calidad

Solo los MSV que se han establecido como estériles y puros (libres de agentes extraños, según se describe en el capítulo 1.1.9, y los que indiquen las autoridades correspondientes que otorgarán la licencia), además de inmunógenos, pueden utilizarse para preparar la producción de virus vacunal.

Para confirmar la identidad del MSV deben utilizarse métodos apropiados (métodos de detección de anticuerpos específicos o de genoma específicos).

c) Validación como cepa vacunal

Se ha observado que la vacuna preparada a partir de MSV es satisfactoria respecto a seguridad y eficacia en el ganado porcino al que va destinado.

De acuerdo con el capítulo 1.1.8, también es necesario minimizar el riesgo de transmisión garantizando que no se utilizan materiales con riesgo de TSE como fuente de virus ni en ninguno de los medios que se empleen para propagar el virus.

El virus vacunal del producto final en general no debe haber sido sometido a más de cinco pases desde el lote del inóculo primario. En el producto comercial, el baculovirus se inactiva, y la vacuna se adyuvanta.

ii) Método de fabricación

a) Procedimiento

El baculovirus se utiliza para infectar una línea celular de insecto estabilizada. Se debe demostrar que este cultivo celular está libre de microorganismos contaminantes y que cumple con los requisitos del capítulo 1.1.8.

Independientemente del método de producción, el sustrato debe recolectarse en condiciones asépticas y puede someterse a métodos adecuados para liberar virus asociados a células. El material recolectado puede volver a procesarse por filtración u otros métodos. Se inactiva el baculovirus residual, preferiblemente empleando un activante de primer orden. El antígeno se homogeneiza antes de la formulación con adyuvante.

b) Requisitos para los ingredientes

Todos los ingredientes que se utilicen para producir la vacuna deben ser acordes a los requisitos del capítulo 1.1.8.

c) Controles durante el proceso

Se realiza un seguimiento de la infectividad, la esterilidad y la masa antigénica. Tras la inactivación, se lleva a cabo una prueba de inocuidad en todos los lotes de antígeno. Las células que se utilicen para comprobar la ausencia de baculovirus vivo residual son de la misma línea celular que para la producción, o bien células de una sensibilidad que pueda ser igual o superior.

d) Pruebas en lotes/series del producto final

- Esterilidad

Debe cumplir con los requisitos del capítulo 1.1.9.

- Identidad

La prueba de identidad se realiza mediante una neutralización vírica con MAb específicos contra el VPPC o una identificación molecular apropiada. Los sueros que se preparan para utilizar en la prueba de identidad no deben prepararse con el virus vacunal homólogo ni antígeno de subunidad expresado en el baculovirus, sino con otra fuente. Esta prueba puede combinarse con la prueba de potencia (véase abajo).

- Seguridad y concepto de prueba de marcador

Se realizan pruebas de seguridad del lote a no ser que se demuestre una seguridad constante en el producto y que esté aprobada en el dossier de registro, y que también esté aprobada la constancia del proceso de producción respecto a los requisitos estándar indicados en el capítulo 1.1.8.

Esta prueba de seguridad en un lote de producto final se lleva a cabo para detectar posibles reacciones adversas anómalas locales o sistémicas.

Para las pruebas de seguridad en lotes/series, se utilizan dos lechones sanos, de 6-10 semanas de edad, que no tengan anticuerpos contra pestivirus. Se administra a cada lechón, por la vía recomendada, una dosis doble de la vacuna formulada. Se observan los lechones durante al menos 14 días para comprobar si presentan reacciones locales o sistémicas a la vacunación. Pasados estos 14 días, a cada uno se le inyecta una segunda dosis normal de la vacuna.

Deben evaluarse las posibles reacciones adversas atribuibles a la vacuna, que podrían impedir la aceptación del lote. La vacuna debe desencadenar anticuerpos contra el antígeno E2 del VPPC, pero no contra el antígeno E^{RNS} del VPPC.

- Potencia del lote/serie

La inducción de anticuerpos anti-E2 específicos en cerdos vacunados puede utilizarse para confirmar la potencia de cada lote una vez el título se ha correlacionado con los resultados de la prueba de eficacia.
- iii) Requisitos para la autorización/registro/licencia
 - a) Proceso de fabricación

Véase el apartado C.2.3.1.
 - b) Identidad

La prueba de identidad se realiza con una neutralización del virus empleando sueros inmunes contra el VPPC. Los sueros que se preparan para utilizar en la prueba de identidad no deben prepararse con el virus vacunal homólogo ni antígeno de subunidad expresado en el baculovirus, sino con otra fuente.
 - c) Requisitos de seguridad
 - Seguridad en animales de corta edad

Para conseguir la aprobación de las autoridades reguladoras, en un lote provisional de la vacuna debe comprobarse si la vacuna genera toxicidad local o sistémica por cada una de las vías de administración recomendadas utilizando 8 lechones de entre 6 y 8 semanas de edad. Deben realizarse pruebas de dosis única y de dosis repetida con vacunas formuladas que contengan la máxima carga permitida. La prueba de la dosis repetida debe corresponder al programa de vacunación primaria (por ejemplo, dos inyecciones) más la primera revacunación (es decir, un total de tres inyecciones). Se comprueba si los animales presentan reacción local o sistémica a la vacunación durante al menos 14 días tras cada inyección. Debe evaluarse toda reacción inesperada atribuible a la vacuna, que podría impedir la aceptación de la misma. Debe demostrarse que la vacuna no desencadena anticuerpos contra el antígeno E^{RNS} del VPPC.
 - Seguridad en cerdas gestantes

Para conseguir la aprobación de las autoridades reguladoras, en un lote provisional de la vacuna deben realizarse pruebas de toxicidad local y sistémica por cada una de las vías de administración recomendadas en el programa de vacunación primaria (por ejemplo, dos inyecciones), utilizando ocho reproductoras gestantes. Se observa a los animales para comprobar si presentan reacciones locales o sistémicas a la vacunación. El periodo de observación llega hasta el momento del parto, para poder comprobar si ha habido efectos perjudiciales en algún momento de la gestación o en la descendencia. Debe evaluarse toda reacción inesperada atribuible a la vacuna, que podría impedir la aceptación de la misma. Debe demostrarse que la vacuna no desencadena anticuerpos contra el antígeno E^{RNS} del VPPC.
 - d) Requisitos de eficacia
 - Dosis protectora

La eficacia de la vacuna se estima en animales vacunados según las recomendaciones del fabricante, siguiendo los métodos que se describen en el apartado C.2.3.3.
 - Protección contra la infección transplacentaria

La vacuna provisional debe superar la prueba que se describe en el apartado C.2.3.3.
 - e) Duración de la inmunidad

Como parte del proceso de autorización, el fabricante debe demostrar la duración de la inmunidad (véase el apartado C.2.3.4).

f) Estabilidad

Como parte de los estudios de determinación del periodo de validez, para la autorización de cualquier vacuna es necesario demostrar su estabilidad. En el caso de los lotes de vacuna contra la PPC desarrollada mediante biotecnología, debe demostrarse que el periodo de validez es como mínimo de 1 año (véase el apartado C.2.3.5).

BIBLIOGRAFÍA

- BECHER P., AVALOS-RAMIREZ R., ORLICH M., CEDILLO-ROSALES S., KÖNIG M., SCHWEIZER M., STALDER H., SCHIRRMIEIER H. & THIEL H.-J. (2003). Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. *Virology*, **311**, 96–104.
- BLOME S., MOSS C., REIMANN I., KONIG P. & BEER M. (2017b). Classical swine fever vaccines – State-of-the-art. *Vet. Microbiol.*, **206**, 10–20.
- BLOME S., STAUBACH C., HENKE J., CARLSON J. & BEER M. (2017c). Classical Swine Fever – An Updated Review. *Viruses*, **9**, 86.
- BLOME S., WERNIKE K., REIMANN I., KONIG P., MOSS C. & BEER M. (2017a). A decade of research into classical swine fever marker vaccine CP7_E2alf (Suvaxyn® CSF Marker): a review of vaccine properties. *Vet. Res.*, **48**, 51.
- BOUMA A., STEGEMAN J.A., ENGEL B., DE KLUIJVER E.P., ELBERS A.R. & DE JONG M.C. (2001). Evaluation of diagnostic tests for the detection of classical swine fever in the field without a gold standard. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **13**, 383–388.
- EDWARDS S., MOENNIG V. & WENSVOORT G. (1991). The development of an international reference panel of monoclonal antibodies for the differentiation of hog cholera virus from other pestiviruses. *Vet. Microbiol.*, **29**, 101–108.
- EUROPEAN COMMISSION (2003). Report on the evaluation of a new Classical swine fever discriminatory test: Commission Decision 2003/265/EC. In: SANCO.10809/2003. European Commission, Directorate-General for Health and Consumer Protection, Brussels, Belgium, 1–71.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) (2008). Annex to *The EFSA Journal*, **932**, 1–18 and **933**, 1–16, page 31.
- GANGES L., CROOKE, H.R., BOHÓRQUEZ J.A., POSTEL A., SAKODA Y., BECHER P. & RUGGLI N. (2020). Classical swine fever virus: the past, present and future. *Virus Res.*, **289**, 198151.
- GONG W., LI J., WANG Z., SUN J., MI S., XU J., CAO J., HOU Y., WANG D., HUO X., SUN Y., WANG P., YUAN K., GAO Y., ZHOU X., HE S. & TU C. (2019). Commercial E2 subunit vaccine provides full protection to pigs against lethal challenge with 4 strains of classical swine fever virus genotype 2. *Vet. Microbiol.*, **237**, 108403.
- HENKE J., CARLSON J., ZANI L., LEIDENBERGER S., SCHWAIGER T., SCHLOTTAU K., TEIFKE J.P., SCHRÖDER C., BEER M. & BLOME S. (2018). Protection against transplacental transmission of moderately virulent classical swine fever virus using live marker vaccine “CP7_E2alf”. *Vaccine*, **36**, 4181–4187.
- HOFFMANN B., BEER M., SCHELP C., SCHIRRMIEIER H. & DEPNER K. (2005). Validation of a real-time RT-PCR assay for sensitive and specific detection of classical swine fever. *J. Virol. Methods*, **130**, 36–44.
- KADEN V., LANGE E., FISCHER U. & STREBELOW G (2000). Oral immunisation of wild boar against classical swine fever: valuation of the first field study in Germany. *Vet. Microbiol.*, **73**, 239–252.
- KADEN V., LANGE E., KÜSTER H., MÜLLER T. & LANGE B. (2010). An update on safety studies on the attenuated “RIEMSER Schweinepestoralvakzine” for vaccination of wild boar against classical swine fever. *Vet. Microbiol.*, **143**, 133–138.
- KARBER G. (1931) Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Archiv für Exp. Pathol. u. Pharmakologie*, **162**, 480–483.
- LIU L., XIA H., EVERETT H., SOSAN O., CROOKE H., MEINDL-BÖHMER A., QIU H.J., MOENNIG V., BELÁK S. & WIDÉN F. (2011). A generic real-time TaqMan assay for specific detection of lapinized Chinese vaccines against classical swine fever. *J. Virol. Methods*, **175**, 170–174.

- McGOLDRICK A., LOWINGS J.P., IBATA G., SANDS J.J., BELAK S. & PATON D.J. (1998). A novel approach to the detection of classical swine fever virus by RT-PCR with a fluorogenic probe (Taq Man). *J. Virol. Methods*, **72**, 125–135.
- MEYER D., FRITSCHÉ S., LUO Y., ENGEMANN C., BLOME S., BEYERBACH M., CHANG C.Y., QIU H.J., BECHER P. & POSTEL A. (2017). The double-antigen ELISA concept for early detection of E^{ms}-specific classical swine fever virus antibodies and application as an accompanying test for differentiation of infected from marker vaccinated animals. *Transbound. Emerg. Dis.*, **64**, 2013–2022.
- MEYER D., LOEFFEN W., POSTEL A., FRITSCHÉ S. & BECHER P. (2018). Reduced specificity of E^{ms} antibody ELISAs for samples from piglets with maternally derived antibodies induced by vaccination of sows with classical swine fever marker vaccine CP7_E2alf. *Transbound. Emerg. Dis.*, **65**, e505–e508.
- OGAWA N., NAKAGAWA H., YAMAMOTO H., SAWADA M., HANAOKI T. & SAZAWA H. (1973). Viral detection in pigs inoculated with the GPE-strain of hog cholera attenuated virus. *Ann. Rep. Nat. Vet. Assay Lab. (Japan)*, **10**, 15–19.
- PANNHORST K., FROHLICH A., STAUBACH C., MEYER D., BLOME S. & BECHER P. (2015). Evaluation of an Erns-based enzyme-linked immunosorbent assay to distinguish classical swine fever virus-infected pigs from pigs vaccinated with CP7_E2alf. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **27**, 449–460.
- PATON D.J., MCGOLDRICK A., BENSUADE E., BELAK S., MITTELHOLZER C., KOENEN F., VANDERHALLEN H., GREISER-WILKE I., SCHEIBNER H., STADEJEK T., HOFMANN M. & THUER B. (2000a). Classical swine fever virus: a second ring test to evaluate RT-PCR detection methods. *Vet. Microbiol.*, **77**, 71–81.
- PATON D.J., MCGOLDRICK A., GREISER-WILKE I., PARCHARIYANON S., SONG J.-Y., LIOU P.P., STADEJEK T., LOWINGS J.P., BJORKLUND H. & BELAK S. (2000b). Genetic typing of classical swine fever. *Vet. Microbiol.*, **73**, 137–157.
- POSTEL A., AUSTERMANN-BUSCH S., PETROV A., MOENNIG V. & BECHER P. (2018). Epidemiology, diagnosis and control of classical swine fever: Recent development and future challenges. *Transbound. Emerg. Dis.*, **65** Suppl. 1, 248–261.
- POSTEL A., SCHMEISER S., BERNAU J., MEINDL-BOEHMER A., PRIDOTKAS G., DIRBAKOVA Z., MOJZIS M. & P. BECHER (2012). Improved strategy for phylogenetic analysis of classical swine fever virus based on full-length E2 encoding sequences. *Vet. Res.*, **43**, 50.
- POSTEL A., SCHMEISER S., ZIMMERMANN B. & BECHER P. (2016). The European classical swine fever virus database: Blueprint for a pathogen-specific sequence database with integrated sequence analysis tools. *Viruses*, **8**, 302.
- RISATTI G., HOLINKA L., LU Z., KUTISH G., CALLAHAN J.D., NELSON W.M., BREA TIO E. & BORCA M.V. (2005). Diagnostic evaluation of a real-time reverse transcriptase PCR assay for detection of classical swine fever virus. *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 468–471.
- SUAREZ M., SORDO Y., PRIETO Y., RODRÍGUEZ M.P., MÉNDEZ L., RODRÍGUEZ E.M., RODRÍGUEZ-MALLON A., LORENZO E., SANTANA E., GONZÁLEZ N., NARANJO P., FRÍAS M.T., CARPIO Y. & ESTRADA M.P. (2017). A single dose of the novel chimeric subunit vaccine E2-CD154 confers early full protection against classical swine fever virus. *Vaccine*, **34**, 4437–4443.
- WENVOORT G., TERPSTRA C., DE KLUYVER E.P (1989a). Characterization of porcine and some ruminant pestiviruses by cross-neutralisation. *Vet. Microbiol.*, **20**, 291–306.
- ZHAO J.J., CHENG D., LI N., SUN Y., SHI Z., ZHU Q.H., TU C., TONG G.Z. & QIU H.J. (2008). Evaluation of a multiplex real-time RT-PCR for quantitative and differential detection of wild-type viruses and C-strain vaccine of Classical swine fever virus. *Vet. Microbiol.*, **126**, 1–10.

*
* *

NB: Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para la peste porcina clásica (puede consultarse la página web de la OIE: <https://www.woah.org/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>)
Por favor, contacte con los Laboratorios de Referencia de la OIE para más información sobre las pruebas de diagnóstico, los reactivos y las vacunas para la peste porcina clásica.

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1990. ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2022.