

CAPÍTULO 3.9.7.

LOS VIRUS DE LA INFLUENZA A PORCINA

RESUMEN

Descripción e importancia de la enfermedad: Los virus de la influenza A porcina (VIA-P) causan una enfermedad respiratoria muy contagiosa que se caracteriza por tos, estornudos, rinorrea, fiebre, letargo, dificultades respiratorias y disminución del apetito. En algunos casos, las infecciones por los VIA-P se asocian a trastornos en la reproducción, como los abortos. Los signos clínicos y la excreción nasal del virus pueden aparecer a las 24 horas de la infección. En las infecciones por los VIA-P las tasas de morbilidad pueden alcanzar el 100%, aunque las de mortalidad son relativamente bajas. Las infecciones bacterianas secundarias pueden exacerbar los síntomas clínicos de una infección por los VIA-P. El contagio tiene lugar por contacto con las secreciones que contengan los VIA-P, como las secreciones nasales y los aerosoles producidos por la tos o el estornudo.

Detección e identificación del agente: Deben obtenerse muestras a las 24–72 horas de la aparición de los signos clínicos. El animal de elección es un cerdo sin tratar que presente signos clínicos compatibles. Se comercializan enzimo-inmunoanálisis (ELISA) de detección de antígeno para la detección de virus de la influenza A y suelen ir dirigidos a la nucleoproteína (NP) conservada. El ARN vírico puede detectarse fácilmente mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) dirigida a la matriz (M) o a los genes que codifican la hemaglutinina (HA), la neuraminidasa (NA) y la nucleoproteína (NP) en muestras de tejidos respiratorios, como tráquea o pulmón e hisopos nasales. Puede utilizarse inmunohistoquímica en tejidos fijados con formalina. La RT-PCR en tiempo real se utiliza cada vez más porque es muy sensible y puede realizarse a gran escala con un coste unitario relativamente bajo. Como muestra de grupo o de población, también puede resultar útil el líquido bucal obtenido con cuerdas de algodón que se cuelgan en el establo. El aislamiento del virus puede lograrse utilizando huevos de ave embrionados, líneas celulares continuas o cultivos celulares primarios. Los virus se pueden subtipificar (HxNy) mediante la identificación de las proteínas de la envoltura vírica (hemaglutinina [HA] y neuraminidasa [NA]) utilizando las pruebas de inhibición de la hemaglutinación (HI) y de inhibición de la neuraminidasa en cepas víricas aisladas, o mediante RT-PCR directa en material clínico o en cepas aisladas. Actualmente, la secuenciación de genes se aplica mucho y puede utilizarse para determinar el subtipo de virus y, lo que es más importante, el genotipo, proporcionando este último datos inestimables asociados a la diversidad genética del VIA-P impulsada tanto por el reordenamiento genético como por la deriva genética continua, especialmente en los genes que codifican la HA y la NA.

Pruebas serológicas: Históricamente, la prueba serológica más importante para la detección de anticuerpos contra los VIA-P es la HI realizada con sueros pareados. La HI es específica de subtipos de la HA. Lo ideal es obtener los sueros con un intervalo de 10–21 días. Un aumento de cuatro veces o más entre el título de la primera muestra y el de la segunda sugiere una infección reciente por los VIA-P. Otras pruebas serológicas útiles son la prueba de inmunodifusión en gel de agar, la inmunofluorescencia indirecta, la neutralización vírica y el ELISA. Debido a la creciente diversidad antigénica de los virus de la influenza A en los cerdos y a la necesidad de utilizar múltiples subtipos H en las HI, en general se tiende a utilizar ELISA comerciales que no sea específicos de subtipo.

Requisitos para las vacunas: Se han comercializado vacunas con VIA-P inactivados y con adyuvante, algunas de las cuales contienen cepas autólogas. Las vacunas pueden incluir antígenos de un único subtipo del VIA-P o bien varios, y lo ideal es que reflejen el perfil antigénico actual de los virus naturales y contener subtipos y cepas que se cambien según necesidad para asegurar la protección.

A. INTRODUCCIÓN

Los virus de la influenza A porcina (VIA-P) causan una enfermedad vírica muy contagiosa de los cerdos que puede tener un importante impacto económico en las piaras afectadas. El VIA-P es un virus con envoltura con un genoma de ARN segmentado, que pertenece al género *Influenzavirus A*, de la familia *Orthomyxoviridae*. Los virus de tipo A se pueden subclasificar en función de las proteínas hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) de la envoltura vírica, las cuales contienen los epítomos inmunodominantes. Los subtipos (HxNy) de VIA-P que se identifican con más frecuencia en los cerdos son los subtipos clásicos y aviáres (av) H1N1, humanos (hu) H1N1 y H1N2, recombinantes (r) H3N2 y rH1N2. Otros subtipos identificados de manera infrecuente en poblaciones de cerdos (aunque no necesariamente se mantengan) son rH1N7, rH3N1, H2N3, avH4N6, avH3N3, y avH9N2. Los virus H1N1, H1N2 y H3N2 de Europa son antigénica y genéticamente distintos de los que se encuentran en América o Asia (Anderson *et al.*, 2016; Brown, 2013; Karasin *et al.*, 2000; 2002; Lewis *et al.*, 2016; Olsen, 2002; Vincent *et al.*, 2009; Watson *et al.*, 2015; Webby *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 1999). Debido a la considerable diversidad genética entre regiones geográficas de los virus H1 que circulan en cerdos, la hemaglutinina H1 puede clasificarse según sus características genéticas en clados; 1A es el linaje clásico derivado de los virus pandémicos humanos de 1918, 1B es el linaje estacional humano asociado a episodios de transmisión de humanos a cerdos en la década de 1990, y 1C es el linaje aviar euroasiático asociado a virus introducidos en cerdos en Europa y Asia a partir de especies aviáres (Anderson *et al.*, 2016).

Las células de los cerdos tienen receptores en su aparato respiratorio que permiten la unión e infección por parte de virus de la influenza A de cerdos, humanos y especies aviáres. En consecuencia, los cerdos se han considerado como “recipientes de mezcla” para el desarrollo de novedosos virus de la influenza a través de la recombinación en los cerdos. Las infecciones por los VIA-P causan una enfermedad respiratoria que se caracteriza por tos, estornudos, rinorrea, fiebre, letargo, dificultad respiratoria y disminución del apetito. Otros agentes que pueden originar una enfermedad respiratoria en los cerdos son el virus del síndrome disgenésico y respiratorio porcino, el virus de la enfermedad de Aujeszky (seudorabia), el coronavirus respiratorio porcino, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hypopneumoniae* y otros agentes bacterianos. Así pues, se precisan estudios de laboratorio para determinar una infección por VIA-P. Pueden tener lugar signos clínicos y excreción nasal de los VIA-P en las 24 horas posteriores a la infección y, por lo general, la excreción cesa 7–10 días después de la infección. En las piaras de cerdos, se pueden dar dos formas de la enfermedad, la epidémica o la endémica. En la forma epidémica el virus pasa rápidamente por todas las fases y el cerdo se recupera rápidamente siempre que no haya factores complicantes, como las infecciones bacterianas secundarias. En la forma endémica los signos pueden ser menos evidentes, y no todos los cerdos presentan los signos clínicos característicos de la infección. En algunos casos, la forma endémica puede afectar a lotes sucesivos de cerdos en una etapa fisiológica determinada (Rose *et al.*, 2013). En todos los casos, la forma endémica es responsable de la persistencia del VIA-P en la pira. Las tasas de morbilidad pueden alcanzar el 100% con las infecciones epidémicas por IVA-P, mientras que las tasas de mortalidad son generalmente bajas. El impacto económico más importante está relacionado con un retraso en el aumento de peso, que se traduce en la necesidad de un mayor número de días para alcanzar el peso adecuado para el mercado. La transmisión tiene lugar por contacto con las secreciones que contienen los VIA-P, tales como la secreción nasal, góticas y los aerosoles producidos por la tos y el estornudo. Pueden darse infecciones por cepas de la denominada variante (v) del VIA-P en los humanos y se han descrito algunas muertes (Lindstrom *et al.*, 2012; Myers *et al.*, 2007; Pulit-Penalosa *et al.*, 2019). Deben tomarse precauciones para impedir las infecciones humanas, 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*. Por el contrario, en ocasiones pueden transmitirse virus de la influenza de las personas a los cerdos, lo cual constituye la denominada zoonosis inversa o antropozoonosis, y crea una oportunidad para que aumenten la diversidad vírica. Los virus de la influenza A también pueden transmitirse ocasionalmente de aves de corral a cerdos, así como de cerdos a aves de corral, especialmente pavos domésticos. En primavera de 2009, se detectó un virus H1N1 (H1N1pdm09) recientemente identificado en personas del hemisferio occidental. Este virus de reciente descubrimiento estaba formado totalmente por genes de VIA-P, pero con un historial de evolución complicado. Los genes de la matriz (M) y la neuraminidasa (NA) eran de VIA-P H1N1 europeo de linaje 1C aviar, y los otros genes eran de VIA-P de Norteamérica de un linaje fruto de una recombinación triple (linajes porcino, aviar y humano) (Zhou *et al.*, 1999). El virus H1N1pdm09 se ha expandido rápidamente por todo el mundo mediante la transmisión entre seres humanos. Pero además de la continua circulación independiente en el ser humano, han tenido lugar casos porcinos por zoonosis inversa tanto en el hemisferio norte como en el sur, de manera simultánea, y el virus se ha vuelto endémico en muchas poblaciones de cerdos de todo el mundo. Posteriormente, el H1N1pdm09 se ha recombinado con otro VIA-P y ha contribuido a la formación de constelaciones genómicas de reciente identificación a nivel mundial (Anderson *et al.*, 2021; Watson *et al.*, 2015).

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la infección por virus de la influenza aviar porcinos y su finalidad

Método	Finalidad					
	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 en tiempo real	+++	+++	+++	+++	++	–
PCR convencional	–	–	–	++	–	–
Detección de la respuesta inmunitaria						
HI	+	+	+	++	++	+++
ELISA	+++	+	++	+	+++	++

Clave: +++ = método recomendado para esta finalidad; ++ = método recomendado, pero tiene limitaciones; + = método adecuado en muy pocas situaciones; – = no adecuado para esta finalidad.

RT-PCR = reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa; HI = inhibición de la hemaglutinación; ELISA = enzimoanálisis; Obsérvese que los ELISA de detección de antígeno están diseñados para ser utilizados en animales con signos clínicos. Su fiabilidad en animales clínicamente sanos es cuestionable. ^(a)En algunas situaciones, puede ser necesario combinar varios métodos de identificación del agente patógeno en la misma muestra clínica.

1. Identificación del agente

Las muestras clínicas y los cultivos de VIA-P deben manipularse aplicando los procedimientos de bioseguridad y bioprotección apropiados, según determine el análisis de riesgo biológico (véase el Capítulo 1.1.4 *Bioseguridad y bioseguridad: Normas para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones para los animales*). Dado que el VIA-P es un posible agente patógeno humano, todo el trabajo con virus infecciosos, muestras de diagnóstico potencialmente infecciosas, huevos embrionados y cultivos celulares debe realizarse en una cabina de seguridad microbiológica (CSM) de clase II. Deben tomarse precauciones de seguridad adicionales (equipo de protección personal) cuando se trabaje con cerdos infectados, como equipo de protección personal respiratorio (EPR) y protección ocular.

1.1. Cultivo

1.1.1. Procesamiento de las muestras

Las muestras respiratorias pueden procesarse para el aislamiento del virus de varias formas, por ejemplo, mediante lavado con medios estériles, que se indican más adelante, o con una maceración del tejido en un mortero, en un digestor, en un homogeneizador, o cortándolo con una hoja de bisturí o con tijeras. El procesamiento del tejido se hace en una solución fisiológica, como un medio de cultivo celular suplementado con antibióticos (por ejemplo, a 10× la concentración de trabajo), a una concentración final del 10–20% (p/v). Los hisopos nasales deben ponerse en un medio de cultivo celular (por ejemplo, suero fetal bovino [FBS] al 1% o medio sin FBS) o en solución salina tamponada con fosfato (PBS) suplementada con antibióticos y 5mg/ml de seroalbúmina bovina. Los líquidos bucales pueden requerir ajustes del método de procesamiento de muestras que se utiliza para los hisopos nasales debido a que la muestra es viscosa y propensa a la

contaminación bacteriana. Lo ideal es enviar las muestras en hielo seco, no congeladas, a un laboratorio de diagnóstico la misma noche. Al llegar al laboratorio, los hisopos nasales se agitan vigorosamente a mano o en un vórtex. Tanto los hisopos nasales como las muestras tisulares se centrifugan a 1.500–1.900 *g* durante 15–30 minutos a 4°C. Se obtiene el sobrenadante y se conserva a 4°C hasta la inoculación. Si el sobrenadante se tiene que mantener más de 24 horas antes de la inoculación, debe guardarse a –70°C o menos. La suspensión tisular clarificada se inocula sin más dilución. El sobrenadante de los hisopos y del líquido bucal se puede inocular también sin diluir o diluido a 1/3 con medio de cultivo. Para reducir la contaminación bacteriana, se añaden antibióticos al medio de cultivo celular utilizado en el procesamiento y/o se filtra el sobrenadante, aunque esto puede disminuir el título vírico. Para la filtración, se recomienda una membrana de baja adsorción proteica, como el PVDF (fluoruro de polivinilideno), con el fin de minimizar la pérdida de virus. Como alternativa, la preparación del virus puede tratarse con antibióticos tales como gentamicina (100 µg/ml) o penicilina (10.000 unidades/ml), estreptomycin (10.000 unidades/ml) y un 2% de fungizona (250 mg/ml) durante 30–60 minutos a 4°C antes de inocular los embriones o los cultivos celulares.

1.1.2. Aislamiento del virus en cultivo celular

- i) El aislamiento del virus se realiza en líneas celulares y en células primarias susceptibles a la infección por virus influenza A (Feng *et al.*, 2011; Karakus *et al.*, 2018). La línea celular Madin–Darby de riñón canino (MDCK) es muy permisiva para distintos subtipos y cepas de VIA-P y, por lo tanto, a menudo es la preferida, aunque también pueden utilizarse líneas celulares primarias de riñón porcino, de testículo porcino, de pulmón porcino o de células traqueales porcinas.
- ii) Se lavan tres veces las monocapas celulares confluentes (48–72 horas después de la inoculación) con medio de cultivo celular sin FBS y que contenga una concentración final de 1 µg/ml de tripsina tratada con TPCK¹; la concentración dependerá del tipo de tripsina y de las células utilizadas (pueden utilizarse hasta 0,3–10 µg/ml). El medio se puede suplementar con antibióticos.
- iii) Se inoculan cultivos celulares con una cantidad adecuada de líquido de lavado, suspensión de tejido, líquidos bucales o sobrenadante de hisopo. Nota: el volumen de inóculo variará con el tamaño del recipiente del cultivo celular. En general, se inoculan de 100 a 200 µl en cada pocillo de una placa de cultivo de 24 pocillos, o 0,5–2 ml en un frasco de 25 cm².
- iv) Se incuban los cultivos celulares inoculados durante 1–2 horas a 37°C, agitándolos de vez en cuando. Cuando se usan cultivos celulares abiertos al medio, como placas de cultivo, la incubación se debe realizar en una cámara húmeda con un 5% de CO₂.
- v) Se elimina el inóculo y se lava la monocapa tres veces con el medio de cultivo que contiene tripsina.
- vi) Se añade un volumen apropiado de un medio de cultivo celular de mantenimiento (como se indica en el paso ii anterior) a todos los recipientes y se incuba a 37°C durante 3–7 días con una comprobación periódica del efecto citopático (ECP). Si al final del período de incubación no se observa ECP, el cultivo celular se puede congelar a –70°C o menos temperatura y descongelar, y realizarse un paso a ciegas como se ha descrito anteriormente (paso iii). Si se observa ECP, se puede analizar una alícuota del medio de cultivo celular para comprobar si contiene virus hemaglutinantes o se puede utilizar la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) para los genes conservados del virus de la influenza, tales como los genes codificantes de la nucleoproteína (NP) o la matriz (M), lo cual ha sustituido en gran medida a las pruebas de confirmación basadas en anticuerpos. Sin embargo, todo el medio de cultivo puede utilizarse en un ensayo HA para detectar partículas víricas. Como alternativa, el sobrenadante del cultivo puede utilizarse como inóculo para la detección del virus mediante ELISA (véase la Sección B.1.5) o mediante la técnica de anticuerpos fluorescentes o técnicas de inmunohistoquímica (IHC) (véanse las Secciones B.1.3 y 1.4, más adelante). Por lo general, pueden inocularse para este fin cultivos en monocapa (es decir, placa de cultivo celular de 24 pocillos) con MDCK (u otra célula apropiada) en monocapa. El procedimiento de aislamiento es el descrito anteriormente

1 TPCK: tosil fenilalanil clorometano

(paso iii). En algunos casos, puede ser necesario hacer diluciones decimales del virus de cultivo celular para lograr un ECP apropiado en la monocapa. Los subtipos de influenza pueden determinarse mediante las pruebas de inhibición de la hemaglutinación (IH) y de inhibición de la neuraminidasa (NI), o mediante RT-PCR en tiempo real o convencional con cebadores validados para una amplificación sensible y específica de genes codificantes de HA y NA individuales (por ejemplo Bonin *et al.*, 2018; Chiapponi *et al.*, 2012; Henritzi *et al.*, 2016; Nagarajan *et al.*, 2010; Ryt-Hansen *et al.*, 2020) o mediante secuenciación génica y comparación de los datos obtenidos con los de swVIA-s previamente caracterizados. Para garantizar la idoneidad para la finalidad de las pruebas, deberá llevarse a cabo una validación con cepas endémicas circulantes en la región, ya que las cepas endémicas de VIA-P pueden variar genéticamente entre regiones.

1.1.3. Inoculación en huevo

- i) Se deben utilizar huevos embrionados de ave de corral de 9–11 días (Senne, 1998).
- ii) Se inoculan 0,1–0,3 ml de inóculo en la cavidad alantoidea y en el saco amniótico; muchos laboratorios inoculan solo por la vía alantoidea con una sensibilidad similar, sin embargo, para el aislamiento primario, la inoculación en el líquido amniótico puede aumentar la sensibilidad. Generalmente se inoculan 3–4 huevos por muestra.
- iii) Se incuban los huevos a 35–37°C durante un máximo de 5 días y se miran al trasluz diariamente. Se desechan los huevos con embriones muertos en un plazo de 24 horas tras la inoculación (que se consideren muertes concomitantes asociadas al proceso de inoculación).
- iv) Se refrigeran los huevos cuyos embriones hayan muerto después de pasadas 24 horas desde la inoculación o al final del período de incubación. Todo el material relacionado con los huevos debe considerarse potencialmente infeccioso y tratarse consecuentemente para evitar la exposición del técnico al VIA-P.
- v) Se recogen los líquidos amniótico y alantoideo; si es necesario, se centrifugan a 1.500–1.900 *g* durante 10–20 minutos a 4°C. Se pasa el sobrenadante a otro tubo para analizarlo.
- vi) Se comprueba si los líquidos contienen VIA-P, con la prueba de hemaglutinación (HA), o mediante ELISA (véase la Sección B.1.5) o por RT-PCR para los genes M o NP (véase la Sección B.1.6).
- vii) Los líquidos que han dado negativo a actividad hemaglutinante (negativos para VIA-P) se vuelven a pasar (hasta 1-2 pases) en huevos o en líneas celulares como se ha descrito anteriormente. El aislamiento puede mejorarse realizando diluciones decimales del líquido en medio de cultivo.

1.1.4. Prueba de hemaglutinación

- i) Se prepara una suspensión al 0,5% de eritrocitos de sangre de pavo macho, de pollo o de cobaya (Takemae *et al.*, 2010). Se distribuye sangre total en un tubo y se añade PBS. Por ejemplo, 10–20 ml de sangre total en un tubo de centrifuga de 50 ml al cual se añade PBS para llenarlo. Con cuidado, se invierte el tubo varias veces para lavar los eritrocitos. Se centrifuga a 800 *g* durante 10 minutos en una centrifuga refrigerada. Se aspira el PBS y la capa leucocitaria (capa de leucocitos) del tubo. Se vuelve a llenar el tubo con PBS fresco y se vuelven a suspender los eritrocitos por completo. Se repite el ciclo de lavado y centrifugación dos veces más. Una vez terminado el lavado, se añaden suficientes eritrocitos al PBS para crear una solución al 0,5%. Algunas cepas víricas aglutinan en mayor o menor medida los eritrocitos de pavo o de cobaya que en los eritrocitos de pollo. Por tanto, puede que sea necesario seleccionar las especies de eritrocitos en función de las cepas que circulan en un área concreta. Los eritrocitos lavados y las suspensiones eritrocitarias al 0,5% se pueden guardar a 4°C hasta una semana. Si se observa hemólisis, se eliminan
- ii) Para cada virus desconocido, se distribuyen 50 µl de PBS en una fila de 8–12 pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos con fondo en V o en U. Debe incluirse como otra línea de pocillos para el control positivo.
- iii) Se añaden 50 µl de cepa sin diluir al primer pocillo de cada fila correspondiente.

- iv) Se realizan diluciones a la mitad seriadas completas de la cepa aislada con una micropipeta ajustada para soltar volúmenes de 50 µl. Las diluciones resultantes oscilarán entre 1/2 (pocillo 1) y 1/2048 (pocillo 11). El pocillo 12 contiene solo PBS y sirve como control de células.
- v) Se añade a cada pocillo 50 µl de suspensión de eritrocitos al 0,5% y se agita la placa para mezclar bien. Nota: los eritrocitos se deben mantener totalmente suspendidos durante el proceso de distribución.
- vi) Se cubre la placa con cinta de sellar y se incuba a temperatura ambiente (24°C) o 4°C hasta que en el pocillo control negativo se forme un botón definido (30–60 minutos).
- vii) Los pocillos con hemaglutinación completa (HA positiva, VIA-P presente) presentarán eritrocitos distribuidos por todo el pocillo dando un aspecto de “alfombra” difusa. Los pocillos con un botón definido de eritrocitos en el fondo del pocillo son negativos para actividad hemaglutinante (negativos para VIA-P). Una actividad HA incompleta se manifiesta por botones parciales caracterizados por márgenes difusos o con aspecto de rosquilla. Cuando la interpretación entre negativa e incompleta es dudosa, se inclina la placa con un ángulo de aproximadamente 45°C durante 20–30 segundos y se comprueba si hay arrastre, que en el caso de pocillos con hemaglutinación negativa produce un aspecto de caída de lágrima translúcida alrededor de las células. Los pocillos con inhibición parcial no producirán caída de lágrima.

1.2. Tipificación de cepas aisladas de virus de la influenza A porcina (VIA-P)

1.2.1. Prueba de inhibición de la hemaglutinación

- i) Se diluyen los antígenos HA de referencia (H1, H3, etc.) a una concentración de 8 unidades HA (HAU) por 50 µl (4 HAU/ 25µl) en PBS 0,01 M, pH 7,2–7,4. Los antígenos de referencia deben representar los que estén circulando activamente en la región en que se encuentren los cerdos. Se puede consultar al Laboratorio de Referencia de la OMSA de la región cuáles son los antígenos de referencia.
- ii) Se estandarizan los virus desconocidos de la gripe A para que contengan 8 HAU en 50 µl.
- iii) Se realiza una titulación por retroceso (prueba HA) para todas las cepas desconocidas y los antígenos del subtipo H para confirmar que están presentes las HAU correctas. Esta titulación se realiza como se describe en el procedimiento de la HA, excepto por el hecho de que se emplean seis diluciones en vez de once.
- iv) Se trata cada suero de referencia (específico para un subtipo de HA individual, recordando que para un mismo subtipo pueden ser necesarios múltiples sueros para poder tener en cuenta toda la diversidad antigénica, y representativo de los virus que estén circulando activamente en la región) con RDE (enzima destructor del receptor); se añaden 50 µl de suero a 200 µl de RDE (dilución 1/10 en solución salina con calcio equivalente a 100 unidades por ml). Se incuba durante la noche (12–18 horas) en un baño de agua a 37°C. Se añaden 150 µl de solución de citrato de sodio al 2,5% y se inactiva por calor durante 30 minutos a 56°C. Se combina la muestra tratada de 200 µl con 25 µl de PBS. Nota: es muy recomendable el tratamiento con RDE, ya que reduce las reacciones inespecíficas y favorece la identificación de las cepas H1N2 y H3N2.
- v) Se eliminan las aglutininas naturales de los sueros de referencia, tratando los sueros diluidos con 0,1 ml de eritrocitos lavados y concentrados por cada 1 ml de suero diluido. Se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente con mezcla ocasional para mantener los eritrocitos suspendidos. Se centrifuga el suero tratado a 800 *g* durante 10 minutos y a continuación se retiene el suero.
- vi) Se añaden 25 µl de antígeno estandarizado (cepa desconocida o antígeno control positivo) a tres pocillos de una placa de microtitulación con 96 pocillos de fondo en V o en U. Se añaden 50 µl de PBS a varios pocillos que servirán de control de eritrocitos. Nota: se pueden utilizar 25 µl de PBS en lugar de los 25 µl de antígeno estandarizado en los pocillos control.
- vii) Se añaden 25 µl del antisuero adecuado de referencia al primer pocillo del subtipo H evaluado. Se hacen diluciones seriadas a la mitad del antisuero en volúmenes de 25 µl en los pocillos del antígeno con una pipeta ajustada para soltar 25 µl. Se repite este procedimiento para cada subtipo H evaluado. Nota: si se utilizaron 25 µl de PBS en lugar de los 25 µl del

antígeno estandarizado en el paso (vi), se añaden 25 µl del antígeno estandarizado a cada pocillo que contenga el antisuero de referencia.

- viii) Se cubren las placas o placa y se incuba a temperatura ambiente durante 10–30 minutos.
- ix) Se añaden 50 µl de suspensión de eritrocitos al 0,5% a cada pocillo y se agitan las placas o placa para mezclar bien. Se mantienen los eritrocitos totalmente en suspensión durante el proceso de distribución.
- x) Se cubren las placas o placa con cinta aislante y se incuban a temperatura ambiente (24°C) o 4°C hasta que se forme un botón definido en los pocillos de suero control positivo (normalmente 30–60 minutos). Se observan las placas después de 20 minutos de incubación para comprobar si presentan hemaglutinación, ya que algunas cepas pueden comenzar a eluirse (separarse de los eritrocitos) a los 30 minutos.
- xi) Se leen los resultados de la prueba como se ha descrito anteriormente para la prueba HA. Una muestra se considera positiva para un determinado subtipo H si se inhibe la hemaglutinación. La prueba se considera válida si el antígeno positivo de referencia y su antígeno homólogo muestran el título de HI esperado (como máximo hasta el doble) y si la titulación por retroceso de cada antígeno (desconocido y control positivo) es de 8 HAU. Si no se cumplen estas condiciones, debe repetirse la prueba.
- xii) Si los eritrocitos de los pocillos de las células control no sedimentan en un botón bien definido, se comprueban como posibles causas: una formulación incorrecta del PBS, una evaporación excesiva de las placas, los eritrocitos son demasiado viejos, o una concentración incorrecta de eritrocitos.

1.2.2. Prueba de inhibición de la neuraminidasa

La identificación de subtipos basada en la prueba NI, que es fiable, queda fuera del alcance de muchos laboratorios. Para la tipificación de las cepas en cuanto a N, se puede consultar a los Laboratorios de Referencia. Estas pruebas cada vez se sustituyen más por PCR o sistemas de secuenciación del gen de la NA.

1.3. Prueba de inmunofluorescencia

1.3.1. Procedimiento analítico

- i) Esta técnica se puede utilizar en cortes de tejidos, en cubres/portas o en placas de 96 pocillos con monocapas celulares infectadas (Vincent *et al.*, 1997). Se deben incluir controles positivos y negativos en todos los procedimientos de tinción.
- ii) Obsérvese que para esta técnica se precisan en gran medida reactivos de referencia representativos de los virus en circulación en la región y lectores con habilidad para diferenciar entre los resultados positivos y la tinción de fondo (especificidad). Este método de detección del virus tiene una sensibilidad más baja que otras pruebas, como la RT-PCR.
- iii) Las células inoculadas se incuban lo suficiente para permitir que el 10–25% de las células se infecten de forma productiva por el virus. Se lavan los cubres o portas con PBS una vez, se ponen en un fijador (paraformaldehído al 4%, acetona al 100% o formalina tamponada normal al 10%) durante 5–10 minutos y se secan al aire. Muchos fijadores deben utilizarse en una cámara aireada.
- iv) Se preparan cortes congelados de tejido en portas de vidrio. Se fijan los portas con acetona durante 5–10 minutos y se secan al aire.
- v) Se aplica el conjugado (anticuerpo contra el VIA-P marcado con fluoresceína) y se incuba en una cámara húmeda a 37°C durante 30 minutos. Preferiblemente, el conjugado debe contener azul de Evans para la tinción de contraste. Obsérvese que es importante utilizar un anticuerpo que reconozca todos los posibles virus que circulen en la zona (por ejemplo, un anticuerpo contra la nucleoproteína de cualquier forma de influenza A).
- vi) Se lava con PBS, pH 7,2, se empapa durante 5–10 minutos con PBS, se lava con agua destilada y se seca al aire.

- vii) Se colocan los cubres sobre portas de vidrio con las células hacia abajo, con un líquido de montaje. Se extrae la goma de ajuste de las cámaras de los portas y se añade el líquido de montaje y después un cubre. Se hace lo mismo para montar los cortes de tejido en portas. Si se utilizan placas de 96 pocillos, no se requiere ni medio de montaje ni portas.
- viii) En una habitación oscura, se observan los portas teñidos con un microscopio de luz ultravioleta. Las células infectadas con VIA-P se identifican porque producen una fluorescencia brillante de color verde manzana. Se recomienda que la persona que examine las muestras tenga experiencia en la observación de muestras marcadas con fluoresceína ya que pueden ser difíciles de interpretar. Cuando se analicen muestras problema para verificar el procedimiento analítico, deben utilizarse portas que se sepa que son positivos o negativos, como base para diferenciar entre una tinción positiva (VIA-P) y una negativa (fondo).

1.4. Inmunohistoquímica

1.4.1. Procedimiento analítico (Vincent *et al.*, 1997)

- i) Se realizan cortes de pulmón fijado con formalina e incluido en parafina de 4 µm de grosor y se colocan en portas recubiertos de poli-L-lisina (como alternativa, pueden emplearse portas cargados comerciales). Para todas las pruebas deben incluirse tejidos control positivo y negativo.
- ii) Se calientan los portas a 60°C durante 15 minutos, se elimina la parafina, y se rehidratan por inmersiones en concentraciones decrecientes de etanol, y luego en agua destilada.
- iii) Se tratan las muestras con peróxido de hidrógeno al 3% durante 10 minutos y se lavan dos veces con agua destilada.
- iv) Se digieren las muestras con proteasa al 0,05% durante 2 minutos y se lavan dos veces durante 2 minutos con tampón Tris/PBS 0,1 M, pH 7,2, a temperatura ambiente.
- v) Se aplica a cada porta el anticuerpo monoclonal primario de ratón anti-VIA-P (dirigido contra la nucleoproteína vírica) a una dilución predeterminada y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente o durante la noche a 4°C. Se lavan los portas con tampón Tris/PBS.
- vi) Se aplica el anticuerpo secundario (anticuerpo biotinilado de cabra anti-ratón) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se lava con tampón Tris/PBS.
- vii) Se aplica el reactivo terciario de desarrollo (estreptavidina conjugada a peroxidasa) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se lava con tampón Tris/PBS.
- viii) Se añade la solución de tetrahidrocloruro de diaminobenzidina durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se lava dos veces con agua destilada.
- ix) Se aplica una tinción de contraste a los portas con la hematoxilina de Gill durante 10–30 segundos, se lavan con agua durante 2 minutos, se deshidratan, limpian y añaden cubres.
- x) Los tejidos infectados por VIA-P se identifican por la presencia de una coloración marrón.

1.5. Enzimoimmunoanálisis de captura de antígeno

Se han comercializado enzimoimmunoanálisis (ELISA) de captura de antígeno tipo A para la detección de los virus de la gripe humana y de gripes animales. Este tipo de pruebas se han utilizado también para detectar los VIA-P en tejido pulmonar y en hisopos nasales (Swenson *et al.*, 2001). Generalmente, las pruebas están disponibles en compañías de los sectores de la sanidad humana y animal. Estas pruebas tienden a tener menos sensibilidad que otras, como la RT-PCR.

1.6. Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa

En la actualidad, el aislamiento convencional del virus y otras técnicas de caracterización para el diagnóstico de los virus de la influenza A porcina siguen siendo un método clave y proporcionan virus para análisis más detallados, como la evaluación *in vivo* y la secuenciación de genes. Además, pueden ser extremadamente útiles para confirmar o refutar la presencia de virus infecciosos cuando todos los resultados de otras pruebas, incluidas la RT-PCR convencional y en tiempo real, son débilmente

positivos. Sin embargo, los métodos convencionales suelen ser caros, lentos y laboriosos. Se han producido enormes avances y mejoras en las técnicas moleculares y otras técnicas de diagnóstico, muchas de las cuales se aplican ahora de forma habitual como primera opción para el diagnóstico de las infecciones por influenza A porcina.

Desde hace algún tiempo, para el diagnóstico, se utilizan preferiblemente técnicas moleculares. Además, recientemente se han producido avances en su aplicación a la detección y caracterización de los virus de la gripe A porcina directamente a partir de muestras clínicas de cerdos infectados. Es imperativo que cuando se utilicen métodos de detección molecular de alta sensibilidad que permitan una rápida detección directa del ARN vírico para el diagnóstico confirmativo de laboratorio de las infecciones por VIA-P, se establezcan protocolos estrictos para prevenir el riesgo de contaminación cruzada entre muestras clínicas. Además, las metodologías de las pruebas de detección de ARN deben validarse según las normas de la OMSA (véase el Capítulo 1.1.6 *Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de enfermedades infecciosas*) utilizando material clínico para demostrar que las pruebas son "aptas para la finalidad definida" para su aplicación en un entorno de diagnóstico de campo, lo que puede incluir el uso de estándares internos. Las reacciones obtenidas con el control permiten una mayor confianza en la integridad de las reacciones moleculares, las muestras clínicas y los resultados.

Además, estas evaluaciones permiten establecer umbrales en las pruebas para decidir qué muestras son positivas y cuáles son negativas. La mayor sensibilidad de la RT-PCR en tiempo real permite la detección de ARN vírico en muestras en ausencia de virus infeccioso, por lo que debe tenerse cuidado al interpretar resultados con límites de detección pequeños, ya que pueden no ser indicativos de infección activa. Este problema puede superarse mediante el análisis de múltiples muestras de la misma cohorte de cerdos infectados.

En entornos con instalaciones más limitadas, las técnicas de RT-PCR en muestras clínicas pueden, con los cebadores correctamente definidos, dar lugar a una rápida detección e identificación del subtipo, incluidos productos de ADNc o PCR que pueden utilizarse para la secuenciación de nucleótidos. La RT-PCR en tiempo real, normalmente basada en el método de la sonda de hidrólisis para la generación de la señal de fluorescencia específica de la diana, se ha convertido en el método de elección en muchos laboratorios para llevar a cabo un diagnóstico, al menos parcial, directamente a partir de muestras clínicas. Este método ofrece resultados rápidos, con una sensibilidad y especificidad comparables a las del aislamiento del virus. Estas son cualidades ideales para el manejo de la enfermedad causada por el VIA-P, en la cual, el periodo de tiempo en el que se puede obtener un diagnóstico inequívoco es crucial para la toma de decisiones. El sistema de diagnóstico mediante RT-PCR en tiempo real adoptado en la mayoría de los laboratorios se ha basado en la detección genérica inicial de VIA-P en muestras clínicas, principalmente dirigiéndose inicialmente a los genes que codifican la matriz (M) o la nucleoproteína (NP), que están muy conservados en todos los virus de la influenza A y son los mejores objetivos para el cribado respecto a la infección por VIA-P mediante RT-PCR, seguido de pruebas específicas de RT-PCR en tiempo real para virus de los subtipos H1 y H3. La secuenciación genómica es necesaria para clasificar mejor los clados H1 (por ejemplo, gamma frente a beta H1) y los clústeres H3 (por ejemplo, cluster IV o 2010.1).

Debido a la gran diversidad de secuencias de los genes de la HA y la NA del virus porcino, puede ser difícil utilizar la RT-PCR en tiempo real para diferenciar entre subtipos y, especialmente, para diferenciar entre distintos linajes dentro de cada subtipo. Por lo tanto, la secuenciación suele ser más precisa.

Se han descrito numerosos ensayos para la detección altamente sensible del gen M (o NP) que cumplen los criterios de una prueba de cribado adecuada. Tras la identificación del nuevo (pandémico) H1N1 en 2009, se adaptaron pruebas moleculares basadas en una RT-PCR en tiempo real para el gen M de la influenza aviar (Spackman *et al.*, 2002) para su uso en porcinos (Slomka *et al.*, 2010). Las modificaciones de tal prueba varían según el país y se puede consultar a un laboratorio de referencia para la influenza porcina para saber cuál es la RT-PCR en tiempo real más adecuada para la región en la que se desee aplicar.

La RT-PCR en tiempo real para la detección de VIA-P que se describe en este capítulo tiene por objetivo el gen de la matriz (M) de los virus Influenza A. El conjunto de cebador/sonda de la matriz es una RT-PCR en tiempo real *quasi*-múltiple en la que se emplea un solo cebador directo, la sonda y dos cebadores inversos. Los dos cebadores inversos pueden detectar de forma genérica la matriz H1N1 de los linajes eurasiático, norteamericano y de la pandemia de 2009.

Para este procedimiento, es fundamental disponer de zonas y equipo exclusivos para la extracción del ácido nucleico, la transferencia del ARN y la preparación de la mezcla primaria. Se necesita una zona “limpia” para preparar los reactivos que se utilizarán para la RT-PCR, que esté libre de ADNc amplificado y de ARN problema.

Tabla 2. Secuencias de la sonda y los cebadores para la hidrólisis de la matriz de VIA-P

Especificidad	Descripción	Secuencia (5' → 3')
Matriz (cualquier virus Influenza A)	Cebador M+25* 5'	AgA TgA gTC TTC TAA CCg Agg TCg
	Sonda M+64*	FAM-TCA ggC CCC CTC AAA gCC gA-BHQ-1
	Cebador M-124* 3'	TgC AAA AAC ATC TTC AAg TCT CTg
	Cebador M-124* SIV 3' **	TgC AAA gAC ACT TTC CAg TCT CTg

* Es la posición del nucleótido en que el extremo 5' de la sonda o del cebador se hibrida con el genoma

** El cebador detecta la matriz del H1N1 pandémico de 2009

- i) Se extrae ácido nucleico de la muestra. Se precisará un control de extracción positivo y uno negativo (denominados PEC y NEC, respectivamente) para confirmar que la extracción ha funcionado.
- ii) Se prepara mezcla primaria para RT-PCR en una sala de PCR “limpia” (Tabla 3).
- iii) Se deposita una alícuota de 17 µl de la mezcla de reacción a cada pocillo de una placa de 96. Se transfieren 8 µl de ARN molde a cada reacción en una sala de transferencia de ARN destinada a este fin. Cuando se utilicen placas de 96 pocillos, se debe emplear una base de soporte para proteger el fondo de la placa de arañazos, huellas digitales o atrapamiento de partículas que pudieran interferir con el sistema óptico y alterar la fluorescencia de fondo.
 - a) En cada ejecución de la PCR tendrán que incluirse los siguientes controles para verificar que la extracción del ARN ha funcionado: un control de extracción positivo (PEC), un control de extracción negativo (NEC), un control de amplificación (molde) positivo (PAC) y un control de amplificación (molde) negativo (NAC). Los PAC se diluyen en cada laboratorio, y para que la ejecución de la prueba se considere válida, el valor de ciclo umbral (C_t) debe ser de entre 21 y 30.
 - iv) Se depositan las muestras en el termociclador y se ejecuta la prueba a los parámetros adecuados.
 - v) Se analizan los resultados. La ejecución de la PCR será válida si:
 - a) El valor de C_t del PAC es un nivel predeterminado que suele situarse en el intervalo 25–30
 - b) El PEC es positivo
 - c) Tanto el NEC como el NAC son negativos
 - d) Todas las muestras y controles que son positivos tienen una “curva sigmoidea”
 - e) Si no se cumplen las condiciones anteriores, la prueba deberá repetirse.

Tabla 3. Ejemplo de Mezcla Primaria para RT-PCR en tiempo real para una reacción de un solo paso

Componente	Concentración final	Volumen por reacción (µl)
H ₂ O	–	0,83
Tampón RT-PCR 2x	1x	12,5
Cebador M+25 5' (20 µM)	200 nM	0,25
Cebador M-124 3' (20 µM)	200 nM	0,25

Componente	Concentración final	Volumen por reacción (μl)
Cebador M-124 SIV 3' (20 μM)	200 nM	0,25
Mezcla de enzima RT-PCR 25×	1×	1
Sonda M+64 (6 μM)	60 nM	0,25
Potenciador de la detección (15×	1×	1,67
Molde	–	8
Volumen de reacción total	–	25

Tabla 4. Ejemplo de parámetros para el termociclador

Fase	Ciclos	Paso	Tiempo	Temperatura
1	1		10 minutos	45°C
2	1		10 minutos	95°C
3	45	desnaturalización	1 segundo	94°C
		hibridación*	30 segundos	60°C
		extensión	15 segundos	72°C

*Captación de fluorescencia

Las cepas víricas aisladas (o de muestras clínicas dependientes del valor C_t) se pueden subtipificar mediante métodos convencionales o PCR en tiempo real, que permite diferenciar los virus HxNy genéticamente distintos de otras cepas conocidas (Bonin *et al.*, 2018; Chiapponi *et al.*, 2012; Henritzi *et al.*, 2016; Larsen *et al.*, 2020). En muchas regiones cada vez se utilizan más PCR en tiempo real diferenciales. Las muestras para el diagnóstico positivas a la RT-PCR de matriz también pueden subtipificarse mediante el uso de RT-PCR de subtipificación según HA y NA. Las muestras cuyas matrices tenga valores de C_t altos pueden no ser detectables mediante dichas RT-PCR de subtipificación y tal vez sea necesario intentar el aislamiento del virus antes de identificar el subtipo. Existen reactivos de RT-PCR de cribado y de subtipificación a la venta, pero cada laboratorio tiene que asegurarse de que detectará los virus influenza que estén en circulación en cada momento en la zona de interés, debido a la creciente variabilidad genética de los genes de la HA y la NA. En muchos casos, resulta necesario llevar a cabo una secuenciación parcial o completa de uno o más genes de VIA-P (como los de la neuraminidasa y la hemaglutinina) para determinar el subtipo del virus detectado. Además, la genotipificación del virus basada en la secuenciación de varios o todos los segmentos génicos cada vez se utiliza más para determinar y realizar un seguimiento de la diversidad vírica. Una herramienta web de nomenclatura universal desarrollada recientemente proporciona un método preciso para asignar designaciones de clados a las secuencias H1-HA; <http://www.fludb.org> (Anderson *et al.*, 2016). La secuenciación de alto rendimiento puede aplicarse para obtener información genómica de la cepa aislada o directamente de muestras de campo para acelerar la caracterización del virus de la influenza (Lee *et al.*, 2016).

Las pruebas deben validarse para la región en la que se van a aplicar, dada la diversidad genética y antigénica mundial del VIA-P.

1.7. Secuenciación génica

En la actualidad, la RT-PCR en tiempo real es el método preferido para la vigilancia del virus, ya que proporciona un diagnóstico rápido y sensible del VIA-P y está disponible en grandes cantidades. Sin embargo, el incremento en el uso de tecnologías de secuenciación, especialmente a medida que se reducen los costes unitarios con la mejora de la tecnología, ofrece grandes oportunidades para detectar y secuenciar simultáneamente a partir de muestras clínicas en un laboratorio o en un entorno de campo, por ejemplo, aplicando la tecnología de nanoporos.

La secuenciación de genes se aplica cada vez más no sólo a la caracterización detallada de virus para su uso en epidemiología molecular, sino también en la subtipificación de virus y la definición de marcadores para toda la gama de hospedadores, incluido el riesgo zoonótico. La metodología de secuenciación de Sanger, muy utilizada desde hace décadas, permite la determinación rápida de un único gen diana (HA) en 24-36 horas y sigue siendo de gran utilidad. Sin embargo, como los datos genómicos pueden determinarse rápidamente mediante la tecnología de secuenciación de próxima generación, permite un análisis más amplio utilizando una serie de herramientas bioinformáticas (Zhang *et al.*, 2017). Por ejemplo, con la llegada de un mayor acceso a la metodología de secuenciación, ya sea a través de laboratorios especializados o de proveedores comerciales, ahora es posible determinar las secuencias genómicas del VIA-P para proporcionar un nivel de caracterización importante en la identificación rápida de agentes patógenos y la investigación de enfermedades. Tradicionalmente, las secuencias de nucleótidos se han utilizado en epidemiología de brotes para inferir el origen del virus y las relaciones precisas entre los diferentes virus asociados dentro del mismo evento (por filogenia) para respaldar la gestión de brotes. Las secuencias genéticas de los genes de la hemaglutinina y la neuraminidasa vírica pueden compararse rápidamente con secuencias conocidas de todos los subtipos que se hallan en bases de datos genéticas y utilizarse para revelar la coincidencia más cercana, identificando así el subtipo de virus y las relaciones filogenéticas. A menudo, esto evita la necesidad de cultivar el virus para una identificación rápida, aunque la fiabilidad y la calidad de los datos se reducen a medida que aumentan los valores umbral de los ciclos en las muestras de las RT-PCR en tiempo real.

Estos análisis se aplican cada vez más a nivel de genoma completo para revelar genotipos de virus y proporcionar una mayor especificidad analítica a los análisis. Tales métodos son especialmente valiosos para el seguimiento, ya que la evolución del virus puede ser mapeada con mayor precisión, incluyendo el cambio a través del reordenamiento genético, un mecanismo clave asociado a la diversidad del virus y la idoneidad para los cerdos. Este enfoque es especialmente valioso para las incursiones tempranas o primeras en un nuevo evento, ya que permite una mayor precisión a la hora de determinar el origen del virus y los mecanismos que conducen a su aparición. La traducción de las secuencias de nucleótidos de todos los segmentos genómicos en secuencias de aminoácidos permite la extracción de datos sobre otras características o rasgos del virus, como el tropismo, los marcadores de rango de hospedador, incluidos los zoonóticos y la susceptibilidad prevista a los fármacos antivirales, que son muy valiosos para respaldar la gestión de los brotes (Garrido-Mantilla *et al.*, 2019; Noronha *et al.*, 2012; Pulit-Penaloza *et al.*, 2019).

2. Pruebas serológicas

La prueba serológica fundamental para la detección de anticuerpos frente al VIA-P es la prueba HI, que es específica de subtipo HA. Los antígenos que se tomen como referencia deberán ser representativos de los linajes genéticos de los virus contemporáneos que estén circulando en la región, y deberán presentar una reacción cruzada lo más amplia posible con el subtipo específico. Debe realizarse sobre sueros pareados obtenidos con un intervalo de 10–21 días. Un aumento de cuatro veces o más en el título entre la primera y la segunda muestra indica una infección reciente por VIA-P. Otras pruebas serológicas que se han descrito, pero que generalmente no se utilizan, son la neutralización vírica (Gauger & Vincent, 2020), la inmunodifusión en gel de agar y la inmunofluorescencia indirecta. Está bien descrita en la literatura la tecnología de un ELISA para la detección de anticuerpos frente al VIA-P, y existen kits en el mercado (Barbé *et al.*, 2009; Ciacci-Zanella *et al.*, 2010).

2.1. Prueba de inhibición de la hemaglutinación

2.1.1. Procedimiento analítico

- i) Se diluyen los antígenos HA de referencia (H1, H3, etc.) hasta una concentración de 4–8 HAU/25 µl con PBS 0,01 M, pH 7,2.
- ii) Se añaden 50 µl de suero a 200 µl de RDE (dilución a 1/10 en solución salina con calcio equivalente a 100 unidades por ml). Se incuba durante la noche (12–18 horas) en un baño de agua a 37°C. Se añaden 150 µl de solución de citrato de sodio al 2,5% y se inactiva por calor durante 30 minutos a 56°C. Se combinan 200 µl de muestra tratada con 25 µl de PBS. Se añaden 50 µl de eritrocitos al 50%. Se agita e incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente o durante la noche a 4°C. Se centrifuga a 800 *g* durante 10 minutos a 4°C. Nota: Los sueros pueden tratarse sin RDE como alternativa utilizando la inactivación por calor y el tratamiento con eritrocitos lavados concentrados. Aunque se recomienda el uso de RDE (o como alternativa con periodato de tripsina o caolín), puede haber variabilidad regional en

cuanto a su disponibilidad y uso para el tratamiento de sueros dependiendo de la especificidad del suero respecto a algunos antígenos usados en la HI (Lanni y Lanni, 1955). Además, ningún tratamiento puede proporcionar resultados satisfactorios para todos los sueros, es decir, el caolín es inespecífico y puede eliminar algunos anticuerpos específicos.

- iii) Se depositan 50 µl de suero tratado en dos pocillos con fondo en V o en U de una placa con 96 pocillos. Se depositan 25 µl de suero tratado en dos pocillos para utilizarlos como suero control. Los sueros control positivo y negativo se tratan del mismo modo que los sueros desconocidos.
- iv) Se depositan 25 µl de PBS en los pocillos de control de suero y en todos los pocillos vacíos, excepto en los dos pocillos identificados como control de células. Se añaden 50 µl de PBS a los pocillos de control de células.
- v) Se hacen diluciones seriadas del suero a la mitad en volúmenes de 25 µl en la placa, y después se añaden 25 µl del antígeno apropiado a todos los pocillos problema, excepto a los que corresponden al suero control y al control de células. Debe tenerse en cuenta que en algunos ensayos en los que se utilizan virus H3N2, se requiere un pretratamiento con oseltamivir para evitar la interferencia de N2 en el ensayo; estos ensayos también suelen utilizar eritrocitos de cobaya. Para más información, contáctese con los Laboratorios de Referencia de la OMSA.
- vi) Se incuban las placas cerradas a temperatura ambiente (24°C) o 4°C durante 30–60 minutos.
- vii) Se añaden 50 µl de suspensión de eritrocitos al 0,5% a cada pocillo, se agita, se incuba a temperatura ambiente (24°C) o 4°C durante 20–30 minutos hasta que se forme un botón definido en el fondo de los pocillos de control de células. Se mantienen los eritrocitos totalmente en suspensión durante el proceso de distribución.
- viii) Se realiza una prueba de HA utilizando los antígenos de la prueba de HI antes de la prueba de HI y simultáneamente a la misma, para verificar que las concentraciones de antígeno son las apropiadas.
- ix) Para que la prueba sea válida, no debe haber hemaglutinación en el pocillo de suero control, ni debe haber inhibición de la hemaglutinación con el suero negativo; además el suero control positivo debe tener su título HI por adelantado (normalmente, como máximo, la mitad) y la titulación por retroceso mediante HA debe indicar 4–8 HAU por 25 µl.

2.2. Enzimoimmunoanálisis

Se ha descrito en la literatura la tecnología ELISA para la detección de anticuerpos frente al VIA-P. Está disponible en forma de kit comercial (Barbe *et al.*, 2009; Ciacci-Zanella *et al.*, 2010).

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

1. Antecedentes

Las directrices para la producción de vacunas veterinarias se presentan en el capítulo 1.1.8 *Principios de producción de vacunas veterinarias*. Las normas indicadas aquí y en el capítulo 1.1.8 son de tipo general y pueden suplementarse con requisitos nacionales y regionales.

1.1. Fundamentos y uso previsto del producto

Las infecciones por VIA-P pueden causar un importante impacto económico a los productores por la reducción de la ingesta de alimento durante la enfermedad, que da lugar a una disminución de la ganancia de peso, un aumento de la edad de sacrificio y un empeoramiento del índice de conversión. Cuando se utiliza la vacunación, el objetivo es reducir el impacto económico de la enfermedad reduciendo la gravedad y duración de los signos clínicos. Además, las vacunas pueden reducir el nivel y la duración de la excreción vírica, un aspecto importante para reducir la transmisión del virus y, al mismo tiempo, minimizar el riesgo de exposición para los cerdos y las personas. Por lo general, estas vacunas

se aplican a las cerdas reproductoras, pero la vacunación de lechones se está generalizando a medida que aumenta la prevalencia del VIA-P. La utilidad y eficacia de la vacunación es muy variable a escala mundial, y hay muchos factores a tener en cuenta (Sandbulte *et al.*, 2015). Hasta la fecha, la mayoría de las vacunas contra VIA-P utilizadas en cerdos han sido vacunas convencionales de virus completo inactivado preparadas a partir de líquido alantoideo infeccioso de huevos de gallina embrionados o líquido de cultivos celulares, inactivados con beta-propiolactona o formalina y emulsionados con adyuvantes de aceite mineral. Las vacunas anti-influenza con virus vivo convencionales se han utilizado a pequeña escala debido al potencial de recombinación, que conlleva un aumento de la virulencia. Las vacunas vivas atenuadas tienden a generar reacciones inmunitarias más amplias al provocar respuestas inmunitarias tanto humorales como celulares, y algunas también pueden tener la ventaja de ser eficaces en presencia de anticuerpos de origen materno. La biotecnología encierra un gran potencial para generar vacunas vivas contra el VIA-P con segmentos genéticos alterados que reduzcan el riesgo de recombinación, limiten la replicación y anulen los aspectos negativos de las vacunas vivas contra el VIA-P.

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

2.1. Características del inóculo

2.1.1. Características biológicas

Las cepas utilizadas en la producción de vacunas deben concordar antigénicamente con las cepas naturales de los VIA-P de los lugares donde se aplique la vacunación. Para la selección pueden utilizarse las pruebas de inhibición de la hemaglutinación y de neutralización que pongan de manifiesto una reactividad cruzada entre antisueros de cerdos vacunados con la cepa vacunal candidata y cepas naturales actuales.

La identidad del inóculo debe estar bien documentada, incluyendo el origen y el historial de países del virus. Deben determinarse las propiedades antigénicas, tales como los subtipos de hemaglutinina (HA) y de neuraminidasa (NA). Para establecer los subtipos de HA y de NA, se puede utilizar la inhibición de la hemaglutinación y la inhibición de la neuraminidasa por antisueros específicos de subtipo o por RT-PCR en tiempo real y secuenciación. También se pueden neutralizar las alícuotas del virus de siembra original (MSV) con antisueros específicos (Gauger y Vincent, 2020), como el antisuero producido contra los VIA-P H1 o H3, y después inocularse en el saco alantoideo de huevos embrionados de pollo de 10 días o en líneas celulares susceptibles, como la MDCK. El líquido alantoideo o el sobrenadante del cultivo celular se recoge después de 72–96 horas de incubación y se comprueba si presenta actividad HA. La identidad se demuestra por la falta de actividad HA en el inóculo neutralizado, y la presencia de actividad HA en el inóculo no neutralizado. Deben confirmarse las diferencias antigénicas significativas presentes en una cepa dada, que la diferencie de otros miembros de su subtipo y que puedan influir positivamente en su empleo como vacuna.

Deben investigarse los factores que pueden contribuir a la inestabilidad durante la producción, como la replicación en una línea celular no común. Si se aprueba la producción para cinco países desde el inóculo original, para confirmar la estabilidad el inóculo vírico puede justificarse la secuenciación de los genes que codifican HA y NA al máximo número de países.

2.1.2. Criterios de calidad (esterilidad, pureza, ausencia de agentes extraños)

Debe demostrarse la pureza del inóculo y de las células utilizadas para la producción de la vacuna. Debe comprobarse que el inóculo original está libre de agentes exógenos, bacterias o *Mycoplasma*, utilizando pruebas que se sepa que son sensibles para detectar estos organismos. La alícuota problema debe ser representativa de un título suficiente para la producción de vacuna, pero no tan alto como para que un suero hiperinmune sea incapaz de neutralizar el virus del inóculo en una prueba de pureza. El virus de siembra se neutraliza con un suero monoespecífico o con un anticuerpo monoclonal contra los VIA-P y la mezcla virus/anticuerpo se cultiva en varios tipos de líneas celulares en monocapa. Los cultivos se subcultivan en países cada 7 días durante un total de 14 días, y a continuación se comprueba si contienen agentes citopáticos y hemadsorbentes.

2.2. Método de fabricación

2.2.1. Procedimiento

Una vez se ha comprobado que la vacuna es eficaz, y que las condiciones de fabricación propuestas resultan aceptables para las autoridades competentes, se puede obtener la aprobación para la producción de la vacuna dependiendo de los requisitos locales. Los VIA-P puede cultivarse en huevos o en cultivo celular. La elección de un método de cultivo depende del grado de adaptación del virus, del crecimiento en el medio, de la tasa de mutación y del rendimiento vírico en el sistema de cultivo concreto. Los productos de vacuna contra los VIA-P deben limitarse a cinco pases desde el MSV para evitar variación genética/antigénica. En general, los sistemas de monocapa o de suspensión celular a gran escala funcionan bajo estrictas condiciones asépticas y de temperatura controlada y con métodos definidos de producción que aseguran una constancia entre lotes. Cuando el virus alcanza su título máximo, determinado por la HA, el ECP, la inmunofluorescencia u otra técnica aprobada, el virus se clarifica, se filtra y se inactiva. Se han utilizado con éxito varios agentes inactivantes, como la formalina, la beta-propiolactona y la etilenimina binaria. Normalmente se añade un adyuvante autorizado para potenciar la respuesta inmunitaria.

2.2.2. Requisitos para los sustratos y los medios

Si comprueba si las células contienen otros virus extraños que puedan haberlas infectado, o bien al inóculo, en pases previos. Los posibles agentes contaminantes son los virus de la diarrea bovina vírica, reovirus, virus de la rabia, virus de la enfermedad de Aujeszky (seudorabia), virus de la gastroenteritis transmisible, coronavirus respiratorio porcino, parvovirus porcinos, adenovirus porcinos, virus de la encefalomiелitis hemaglutinante, rotavirus porcinos, circovirus porcinos, y virus del síndrome disgenésico y respiratorio porcino. Las líneas celulares en las que se analiza el inóculo incluyen: una línea celular de riñón de mono verde africano (Vero) (para rabia y reovirus), una línea celular porcina, una línea celular de la especie de células utilizada para propagar el inóculo, si no es de origen porcino, y líneas celulares de cualquier otra especie por las que se haya pasado el inóculo. Además, se recomienda una línea celular muy permisiva para el virus de la diarrea bovina vírica, tipos 1 y 2. El virus de la diarrea bovina vírica es un posible contaminante introducido por el empleo del suero bovino fetal en los sistemas de cultivo celular.

2.2.3. Controles durante el proceso

Los cultivos celulares deben comprobarse macroscópicamente para descartar anomalías o signos de contaminación y se deben desechar si no resultan satisfactorios. Un lote está listo para la recogida cuando el ECP vírico alcanza el 80–90%. La concentración de virus se puede determinar utilizando la masa de antígeno o pruebas de infectividad.

2.2.4. Pruebas en lotes de producto final

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

i) Esterilidad y pureza

Durante la producción se deben realizar pruebas para comprobar si la vacuna presenta contaminación por bacterias, *Mycoplasma* u hongos, tanto en los lotes de recogida de vacunas inactivadas como en los de las vivas, y se deben confirmar en el producto final (véase el capítulo 1.1.9 *Pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación en los materiales biológicos de uso veterinario*).

ii) Inocuidad

Debe llevarse a cabo un estudio de la cinética de inactivación utilizando el agente inactivante autorizado en un lote de virus con un título mayor que el título máximo de producción y cultivado utilizando el método de producción aprobado. Este estudio debe poner de manifiesto que el método de inactivación es suficiente para garantizar la completa inactivación del virus. Deben tomarse muestras a intervalos periódicos durante la inactivación, inocularse en una línea celular susceptible o en el saco alantoideo de huevos

embrionados; estas muestras deberán indicar una pérdida lineal o completa de título al final del proceso de inactivación. Esto significa menos de una partícula por 10^4 litros de líquido tras la inactivación.

iii) Potencia del lote

Durante la producción, se mide el contenido antigénico para comprobar que se han logrado los títulos mínimos en la vacuna sin envasar. Generalmente, el contenido antigénico se mide antes de la inactivación y previamente a cualquier proceso posterior. Entre las pruebas que pueden utilizarse para determinar el contenido antigénico en el producto final están el ELISA para potencia relativa, la HA y la HI. Es necesario confirmar la sensibilidad, especificidad, reproducibilidad y exigencia de tales pruebas.

La prueba de potencia establecida en el momento del estudio de protección mínima contra el antígeno debe utilizarse para evaluar nuevos lotes para el lanzamiento al mercado. La prueba tiene que ser específica y reproducible. Debe ser fiable para detectar vacunas que no sean suficientemente potentes. Si se utiliza serología en animales de laboratorio en lugar de serología porcina, primero debe comprobarse que la vacunación del animal de laboratorio induce una respuesta específica, sensible y dependiente de la dosis que deberá medirse en la prueba de potencia, y que se correlacione con la protección en los cerdos. Una alternativa estándar son las unidades de hemaglutinación (HAU, por las siglas en inglés de *hemagglutination units*) o las unidades de neutralización en cobayas (GMNU [media geométrica de unidades neutralizantes], por las siglas en inglés de *geometric mean of neutralising units*) inducidas en tras dos aplicaciones de 0,5 ml de vacuna).

2.3. Requisitos para la aprobación del registro

2.3.1. Requisitos de inocuidad

i) Inocuidad en especies de destino y no de destino

Deben probarse la seguridad del producto acabado de vacunas inactivadas en muestras extraídas del recipiente final aplicadas a ratones. En general, los cerdos sanos en edad de destete o mayores, así como las cerdas gestantes en cualquier fase de la gestación pueden vacunarse de forma inocua con vacunas inactivadas contra los VIA-P inactivadas. El producto final puede evaluarse en el animal hospedador utilizando dos animales de la edad mínima recomendada para su uso, según las instrucciones de la etiqueta; los animales se observan durante 21 días. También se recomienda llevar a cabo pruebas de inocuidad de campo en animales vacunados, en al menos tres zonas geográficas distintas, y con un mínimo de 300 animales por zona.

ii) Reversión a la virulencia en vacunas atenuadas/vivas

La reversión a la virulencia en vacunas con virus vivo a menudo se pone de manifiesto mediante pases inversos por especies susceptibles. Se aísla virus del animal vacunado y, a continuación, el virus aislado se utiliza para inocular otros animales. En pases posteriores por animales debe observarse que estos permanecen clínicamente sanos sin presentar los característicos signos del VIA-P.

iii) Consideraciones medioambientales

Las vacunas inactivadas contra los VIA-P no conllevan un peligro concreto para el usuario, aunque la inoculación accidental puede dar lugar a una reacción adversa causada por el adyuvante y componentes secundarios de la vacuna. Las vacunas con virus vivo modificado pueden suponer un peligro para el usuario en función del nivel de inactivación del virus y de la susceptibilidad del ser humano al virus adaptado a las especies porcinas.

Deben evitarse los conservantes siempre que sea posible, y cuando no lo sea, deben utilizarse a la concentración más baja posible. El conservante más frecuente es el timerosal, a una concentración no superior al 0,01% (1/10.000). Pueden utilizarse antibióticos como

conservantes en vacunas contra los VIA-P, pero pueden utilizarse tipos y cantidades limitadas. También existen restricciones en cuanto a los antibióticos residuales de los medios de cultivo celular que puedan quedar en el producto final. Por ejemplo, la cantidad total de conservante y de gentamicina residual no debe superar los 30 mcg por ml de vacuna.

Los frascos, jeringas y agujas que hayan sido utilizados para la administración de la vacuna pueden suponer un riesgo ambiental en el caso de las vacunas que contienen adyuvantes o conservantes, así como en el caso de las vacunas con virus vivos modificados. Deben incluirse instrucciones de eliminación del producto en la información del envase de la vacuna, en base a la normativa medioambiental en vigor de cada país.

2.3.2. Requisitos de eficacia

i) Para la producción animal

En estudios de vacunación/desafío con cerdos en los que se utilicen cepas de desafío homólogas y heterólogas se observará el grado de protección que ofrece la vacuna. Los cerdos que se utilicen en dichos estudios deben estar libres de anticuerpos contra los VIA-P al inicio de la fase experimental. Deben llevarse a cabo estudios de vacunación/desafío utilizando virus producidos mediante el método de producción previsto, al máximo pase de virus permitido, y utilizando cerdos de la edad mínima recomendada indicada en la etiqueta. Inicialmente, se formulan lotes que contengan distintas cantidades de antígeno vírico. El lote problema que con la mínima cantidad de antígeno que presente protección se considerará el estándar contra el cual se midan los futuros lotes de producción. El mejor criterio para las evaluaciones ciegas de los resultados de los grupos de tratamiento es una reducción estadísticamente significativa del virus (títulos y duración de la excreción) en el tracto respiratorio de los cerdos vacunados. Las diferencias en los signos clínicos y las lesiones pulmonares también se encuentran entre los criterios que se utilizan en la evaluación de una prueba exitosa. Si van a utilizarse métodos analíticos *in-vivo* e *in-vitro* para determinar la potencia de cada lote de producción de vacuna, estas pruebas deben llevarse a cabo paralelamente con las pruebas de antígeno mínimo, con el fin de establecer los criterios de lanzamiento de la vacuna al mercado. En algunos países se dispone de vacunas combinadas que contienen más de una cepa de VIA-P. Debe establecerse la eficacia de cada uno de los distintos componentes de estas vacunas de forma independiente, y a continuación de forma combinada en caso de que exista interferencia entre los distintos antígenos.

Antes de que se apruebe un producto, debe determinarse la duración de la inmunidad y la frecuencia de vacunación recomendada. En principio, esta información se adquiere directamente a partir de estudios de vacunación y desafío utilizando el animal hospedador. El período de protección observada, medido por la capacidad de los animales vacunados de resistir las inoculaciones de desafío en una prueba validada, se puede especificar en las indicaciones del prospecto de la vacuna comercial. Una vez que se ha identificado una prueba de potencia adecuada, si la deriva antigénica requiriese reemplazar las cepas de la vacuna, se pueden examinar cepas del mismo subtipo en el animal hospedador o en un modelo apropiado de animal de laboratorio. Otros factores que intervienen son el adyuvante y la dosis antigénica. En consecuencia, parece que la eficacia de una vacuna siempre tiene que ser evaluada en el cerdo.

Si la vacuna va a utilizarse en cerdos destinados a ser comercializados y al consumo humano, debe establecerse un periodo de retirada compatible con el adyuvante utilizado (en general, 21 días), por un medio de un examen histopatológico enviado a las autoridades competentes en seguridad sanitaria de los alimentos.

ii) Para el control y la erradicación

Se aplican los mismos principios que para la utilización en producción animal. Además, debe tenerse en cuenta que las respuestas inmunitarias en animales vacunados pueden no diferenciarse de las de aquellos expuestos al virus natural. Por tanto, cuando para

determinar si ha habido exposición al virus natural se utilicen métodos serológicos junto con una valoración de los signos clínicos compatibles, tendrán que identificarse claramente los animales vacunados.

2.3.3. Estabilidad

Las vacunas deben guardarse con la mínima exposición posible a la luz y a 4°C±2°C, o según aprueben las autoridades competentes designadas. El periodo de validez debe determinarse aplicando la prueba de potencia aprobada a lo largo del periodo de viabilidad propuesto.

BIBLIOGRAFÍA

- ANDERSON T.K., MACKEN C.A., LEWIS N.S., SCHEUERMANN R.H., VAN REETH K., BROWN I.H., SWENSON S., SIMON G., SAITO T., BERHANE Y., CIACCI-ZANELLA J., PEREDA A., DAVIS T., DONIS R.O., WEBBY R.J. & VINCENT A.L. (2016). A Phylogeny-Based Global Nomenclature System and Automated Annotation Tool for H1 Hemagglutinin Genes from Swine Influenza A Viruses. *mSphere*, **1**, doi:10.1128/mSphere.00275-16
- ANDERSON T.K., CHANG J., ARENDSEE Z.W., VENKATESH D., SOUZA C.K., KIMBLE J.B., LEWIS N.S., DAVIS C.T. & VINCENT A.L. (2021). Swine Influenza A Viruses and the Tangled Relationship with Humans. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **11** (3):a038737. doi: 10.1101/cshperspect.a038737.
- BARBE F., LABARQUE G., PENZAERT M. & VAN REETH K. (2009). Performance of a commercial swine influenza virus H1N1 and H3N2 antibody enzyme-linked immunosorbent assay in pigs experimentally infected with European influenza viruses. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **21**, 88–96.
- BONIN E., QUÉGUINER S., WOULDSTRA C., GORIN S., BARBIER N., HARDER T.C., FACH P., HERVÉ S. & SIMON G. (2018). Molecular subtyping of European swine influenza viruses and scaling to high-throughput analysis. *Virol. J.*, **15**, 7.
- BROWN I.H. (2013). History and epidemiology of swine influenza in Europe. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.*, **370**, 133–146.
- CHIAPPONI C., MORENO A., BARBIERI I., MERENDA M. & FONI E. (2012) Multiplex RT-PCR assay for differentiating European swine influenza virus subtypes H1N1, H1N2 and H3N2. *J. Virol. Methods*, **184**, 117–120.
- CIACCI-ZANELLA J.R., VINCENT A.L., PRICKETT J.R., ZIMMERMAN S.M. & ZIMMERMAN J.J. (2010). Detection of anti-influenza A nucleoprotein antibodies in pigs using a commercial influenza epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assay developed for avian species. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **22**, 3–9.
- FENG S.-Z., JIAO P.-R., QI W.-B., FAN H.-Y. & LIAO. M. (2011). Development and strategies of cell-culture technology for influenza vaccine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **89**, 893–902. doi 10.1007/s00253-010-2973-9.
- GARRIDO-MANTILLA J., ALVAREZ J., CULHANE M., NIRMALA J., CANO J.P. & TORREMORELL M. (2019). Comparison of individual, group and environmental sampling strategies to conduct influenza surveillance in pigs. *BMC Vet. Res.*, **15**, 61. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1805-0>.
- GAUGER P.C. & VINCENT A.L. (2020). Serum Virus Neutralization Assay for Detection and Quantitation of Serum Neutralizing Antibodies to Influenza A Virus in Swine. In: *Animal Influenza Virus. Methods in Molecular Biology*, Vol. 2123, Spackman E., ed. Humana, New York, USA. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0346-8_23
- HENRITZI D., ZHAO N., STARICK E., SIMON G., KROG J.S., LARSEN L.E., REID S.M., BROWN I.H., CHIAPPONI C., FONI E., WACHECK S., SCHMID P., BEER M., HOFFMANN B. & HARDER T.C. (2016). Rapid detection and subtyping of European swine influenza viruses in porcine clinical samples by haemagglutinin- and neuraminidase-specific tetra- and triplex real-time RT-PCRs. *Influenza Other Resp. Viruses*, **10**, 504–517. doi: 10.1111/irv.12407
- KARASIN A.I., LANDGRAF J., SWENSON S., ERICKSON G., GOYAL S., WOODRUFF M., SCHERBA G., ANDERSON G. & OLSEN C.W. (2002). Genetic characterization of H1N2 influenza A viruses isolated from pigs throughout the United States. *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 1073–1079.
- KARASIN A.I., SCHUTTEN M.M., COOPER L.A., SMITH C.B., SUBBARAO K., ANDERSON G.A., CARMAN S. & OLSEN C.W. (2000). Genetic characterization of H3N2 influenza viruses isolated from pigs in North America, 1977–1999: evidence for wholly human and reassortant virus genotypes. *Virus Res.*, **68**, 71–85.

- KARAKUS U., CRAMERI M., LANZ C. & YÁNGÜEZ E. (2018). Propagation and Titration of Influenza Viruses. *Methods Mol. Biol.*, **1836**, 59–88. doi: 10.1007/978-1-4939-8678-1_4.
- LANNI F. & LANNI Y.T. (1955) Influenza virus as enzyme: Mode of action against inhibitory mucoprotein from egg white., *Virology*, **1**, 40–57 doi.org/10.1016/0042-6822(55)90005-2
- LARSEN H., GOECKE N.B. & HJULSAGER C.K. (2020). Subtyping of Swine Influenza Using a High-Throughput Real-Time PCR Platform and a Single Microfluidics Device. *In: Nucleic Acid Detection and Structural Investigations. Methods in Molecular Biology*, Vol. 2063, Astakhova K. & Bukhari S., eds. Humana, New York, USA. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0138-9_2
- LEE H.K., LEE C.K., TANG J.W., LOH T.P. & KOAY E.S. (2016). Contamination-controlled high-throughput whole genome sequencing for influenza A viruses using the MiSeq sequencer. *Sci Rep.*, **6**, 33318. doi: 10.1038/srep33318. PMID: 27624998; PMCID: PMC5022032.
- LEWIS N.S., RUSSELL C.A, LANGAT P., ANDERSON T.K., BERGER K., BIELEJEC F., BURKE D.F., DUDAS G., FONVILLE J.M., FOUCHIER R.A.M, KELLAM P., KOEL B.F., LEMEY P., NGUYEN T, NUANSRICHY B., PEIRIS J.S.M., SAITO T., SIMON G, SKEPNER E., TAKEMAE N., WEBBY R.J., VAN REETH K., BROOKES S.M, LARSEN L., WATSON S.J., BROWN I.H. & VINCENT A.L (2016). The global antigenic diversity of swine influenza A viruses. *Elife*, 5:e12217. doi: 10.7554/eLife.12217.
- LINDSTROM S., GARTEN R., BALISH A., SHU B., EMERY S., BERMAN L., BARNES N., SLEEMAN K., GUBAREVA L., VILLANUEVA J. & KLIMOV A. (2012). Human infections with novel reassortant influenza A(H2N2)v viruses, United States, 2011. *Emerg. Infect. Dis.*, **18**, 834–837.
- LOPEZ MORENO G., NIRMALA J., GOODELL C., CULHANE M. & TORREMORELL M. (2021). Shedding and transmission of a live attenuated influenza A virus vaccine in pre-weaned pigs under field conditions. *PLoS One*, **16**(2):e0246690. doi: 10.1371/journal.pone.0246690.
- MYERS K.P., OLSEN C.W. & GRAY G.C. (2007). Cases of swine influenza in humans: a review of the literature. *Clin. Infect. Dis.*, **44**, 1084–1088.
- NAGARAJAN M.M., SIMARD G., LONGTIN D. & SIMARD C. (2010). Single-step multiplex conventional and real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays for simultaneous detection and subtype differentiation of Influenza A virus in swine. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **22**, 402–408.
- NORONHA J.M., LIU M., SQUIRES R.B., PICKETT B.E., HALE B.G., AIR G.M., GALLOWAY S.E., TAKIMOTO T., SCHMOLKE M., HUNT V., KLEM E., GARCÍA-SASTRE A., MCGEE M. & SCHEUERMANN R.H. (2012). Influenza Sequence Feature Variant Type (Flu-SFVT) analysis: evidence for a role of NS1 in influenza host range restriction. *J. Virol.*, **86**, 5857–5866. doi: 10.1128/JVI.06901-11. PMID: 22398283
- OLSEN C.W. (2002). Emergence of novel strains of swine influenza virus in North America, *In: Trends in Emerging Viral Infections of Swine*, Morilla A., Yoon K.J. & Zimmerman J.J., eds. Iowa State University Press, Iowa, USA, 37–43.
- PULIT-PENALOZA J.A., BELSER J.A., TUMPEY T.M. & MAINES T.R. (2019). Sowing the Seeds of a Pandemic? Mammalian Pathogenicity and Transmissibility of H1 Variant Influenza Viruses from the Swine Reservoir. *Trop. Med. Infect. Dis.*, **4**, 41. doi: 10.3390/tropicalmed4010041.
- ROSE N., HERVE S., EVENO E., BARBIER N., EONO F., DORENOR V., ANDRAUD M., CAMSUSOU C., MADEC F. & SIMON G. (2013). Dynamics of influenza A virus infections in permanently infected pig farms: Evidence of recurrent infections, circulation of several swine influenza viruses and reassortment events. *Vet. Res.*, **44**, 72. doi:10.1186/1297-9716-44-72.
- RYT-HANSEN P., PEDERSEN A.G., LARSEN I., KRISTENSEN C.S., KROG J.S., WACHECK S. & LARSEN L.E. (2020). Substantial Antigenic Drift in the Hemagglutinin Protein of Swine Influenza A Viruses. *Viruses*, **12**, 248. <https://doi.org/10.3390/v12020248>.
- SANDBULTE M., SPICKLER A., ZAABEL P. & ROTH J. (2015). Optimal use of vaccines for control of influenza a virus in swine. *Vaccines (Basel)*, **3**, 22–73. doi 10.3390/vaccines3010022.
- SENNE D.A. (1998). Virus propagation in embryonating eggs. *In: A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens*, Fourth Edition, Swayne D.E., Glisson J.R., Jackwood M.W., Pearson J.E. & Reed W.M., eds. American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, Pennsylvania, USA, 235–240.

SLOMKA M.J., DENSHAM A.L., COWARD V.J., ESSEN S., BROOKES S.M., IRVINE R.M., SPACKMAN E., RIDGEON J., GARDNER R., HANNA A., SUAREZ D.L. & BROWN I.H. (2010). Real time reverse transcription (RRT)-polymerase chain reaction (PCR) methods for detection of pandemic (H1N1) 2009 influenza virus and European swine influenza A virus infections in pigs. *Influenza Other Respir. Viruses*, **4**, 277–293.

SPACKMAN E., SENNE D.A., MYERS T.J., BULAGA L.L., GARBER L.P., PERDUE M.L., LOHMAN K., DAUM L.T. & SUAREZ D.L. (2002) Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 3256–3260.

SWENSON S.L., VINCENT L.L., LUTE B.M., JANKE B.H., LECHTENBERG K.E., LANDGRAF J.G., SCHMITT B.J., KINKER D.R. & McMILLEN J.K. (2001). A comparison of diagnostic assays for the detection of type A swine influenza virus from nasal swabs and lungs. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **13**, 36–42.

TAKEMAE N., RUTTANAPUMMA R., PARCHARIYANON S., YONEYAMA S., HAYASHI T., HIRAMATSU H., SRIWILAJAROEN N., UCHIDA Y., KONDO S., YAGI H., KATO K., SUZUKI Y. & SAITO T. (2010). Alterations in receptor-binding properties of swine influenza viruses of the H1 subtype after isolation in embryonated chicken eggs. *J. Gen. Virol.*, **91**, 938–948. doi: 10.1099/vir.0.016691-0.

VINCENT L.L., JANKE B.H., PAUL P.S. & HALBUR P.G. (1997). A monoclonal-antibody-based immunohistochemical method for the detection of swine influenza virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **9**, 191–195.

VINCENT A.L., MA W., LAGER K.M., GRAMER M.R., RICHT J.A. & JANKE B.H. (2009). Characterization of a newly emerged genetic cluster of H1N1 and H1N2 swine influenza virus in the United States. *Virus Genes*, **39**, 176–185. doi: 10.1007/s11262-009-0386-6.

WATSON S.J., LANGAT P., REID S.M., TSAN-YUK LAM T., COTTON M., KELLY M., VAN REETH K., QIU Y, SIMON G., BONIN E., FONI E., CHIAPPONI C, LARSEN L., HJULSAGER C., MARKOWSKA-DANIEL I., URBANIAK K., DÜRRWALD R., SCHLEGEL M., HUOVILAINEN A., DAVIDSON I., DÁN A., LOEFFEN W., EDWARDS S., BUBLOT M., VILA T., MALDONADO J., VALLS L., ESNIP3 CONSORTIUM, BROWN I.H, PYBUS O.G. & KELLAM P. (2015). Molecular Epidemiology and Evolution of Influenza Viruses Circulating within European Swine between 2009 and 2013. *J. Virol.*, **89**, 9920–9931.

WEBBY R.J., ROSSOW K., ERICKSON G., SIMS Y. & WEBSTER R. (2004). Multiple lineages of antigenically and genetically diverse influenza A virus co-circulate in the United States swine population. *Virus Res.*, **103**, 67–73.

ZHANG Y., AEVERMANN B.D., ANDERSON T.K., BURKE D.F., DAUPHIN G., GU Z., HE S., KUMAR S., LARSEN C.N., LEE A.J., LI X., MACKEN C., MAHAFFEY C., PICKETT B.E., REARDON B., SMITH T., STEWART L., SULOWAY C., SUN G., TONG L., VINCENT A.L., WALTERS B., ZAREMBA S., ZHAO H., ZHOU L., ZMASEK C., KLEM E.B. & SCHEUERMANN R.H. (2017). Influenza Research Database: An integrated bioinformatics resource for influenza virus research. *Nucleic Acids Res.*, **45** (D1), D466–D474.

ZHOU N.N., SENNE D.A., LANDGRAF J.S., SWENSON S.L., ERICKSON G., ROSSOW K., LIU L., YOON K.J., KRAUSS S. & WEBSTER R.G. (1999). Genetic reassortment of avian, swine, and human influenza A viruses in American pigs. *J. Virol.*, **73**, 8851–8856

*
* *

NB: Existen Laboratorios de Referencia de la OMSA para la influenza A porcina
(puede consultarse la página web de la OMSA:

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

Por favor, contacte con el Laboratorio de Referencia de la OMSA para cualquier otro dato sobre las pruebas de diagnóstico, los reactivos y las vacunas para la influenza A porcina.

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 2004. ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2023.