

SÍNDROME REPRODUCTIVO Y RESPIRATORIO PORCINO

RESUMEN

El síndrome reproductivo y respiratorio porcino (SRRP) se caracteriza por alteraciones de la reproducción en las cerdas y por problemas respiratorios en los lechones y los cerdos de engorde. La enfermedad está causada por el virus del SRRP (VSRRP), un virus clasificado actualmente como miembro del orden de los Nidovirales, familia Arteriviridae, género Arterivirus. La diana celular primaria de los virus son macrófagos diferenciados de los cerdos, principalmente alveolares, aunque también de otros tejidos. Existen dos tipos principales que son antigénicamente diferentes: el Tipo 1 (antes denominado europeo – EU) y el Tipo 2 (antes denominado norteamericano – NA). Históricamente, el Tipo 1 se ha restringido a Europa, y el Tipo 2, a Norteamérica; actualmente, ambos se encuentran en todo el mundo. Este virus se transmite principalmente mediante el contacto directo pero también por el contacto con heces, orina, esperma o fómites. Asimismo, también se ha confirmado la posibilidad de la propagación mediante insectos vectores (moscas y mosquitos) y aerógena a distancias cortas. El virus del SRRP se encuentra distribuido en casi todas las partes del mundo en que se lleva a cabo una producción intensiva de los cerdos. El fracaso reproductivo se caracteriza por infertilidad, momificación fetal, abortos, nacidos muertos, y el nacimiento de lechones débiles que a menudo mueren poco después de nacer por trastornos respiratorios e infecciones secundarias. Los cerdos de más edad pueden presentar signos leves de enfermedad respiratoria, generalmente complicada por infecciones secundarias. En 2006, en China (Rep. Pop. de) emergió una cepa del VSRRP altamente patógena que causaba fiebres altas (40–42°C) en todos los grupos de edad, abortos en las cerdas y mortalidad alta en los lechones, tanto lactantes como destetados y de engorde.

Identificación del agente: *El diagnóstico de la infección por el VSRRP es difícil; el virus puede aislarse de cerdos afectados a partir del suero o de muestras de órganos, como pulmones, amígdalas, ganglios linfáticos y bazo. Para el aislamiento del virus se recomienda el uso de macrófagos alveolares porcinos porque constituyen uno de los medio de cultivo más susceptibles para los virus de ambos tipos. Hallazgos recientes han permitido comprobar que los macrófagos derivados de monocitos porcinos también pueden utilizarse para el aislamiento del VSRRP de y la propagación en cultivo celular. Las células MARC-145 (clon MA-104) son adecuadas para el aislamiento del VSRRP Tipo 2. También son adecuadas las células MARC-145 (clon MA-104). Existe variabilidad entre lotes de macrófagos en cuanto a su susceptibilidad frente al virus del SRRP. Por tanto, es necesario identificar a un grupo con elevada susceptibilidad y conservar esta reserva en nitrógeno líquido hasta su utilización. El virus se identifica y caracteriza mediante inmunotinción con antisueros específicos o anticuerpos monoclonales. Se han desarrollado técnicas adicionales, como la técnica inmunohistoquímica y la hibridación in situ sobre tejidos fijados y la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa para la confirmación en el laboratorio de la infección por el virus del SRRP.*

Pruebas serológicas: *Hoy en día se dispone de una gran variedad de pruebas serológicas para detectar en el suero, en líquidos bucales o en jugo de carne los anticuerpos contra el VSRRP. La técnica de la inmunoperoxidasa en monocapa y la prueba de la inmunofluorescencia en la que se utilizan macrófagos alveolares o células MARC-145 pueden emplearse para la detección de anticuerpos específicos del VSRRP, Tipo 1 y Tipo 2. En la actualidad, para el diagnóstico del VSRRP lo más habitual es utilizar enzimoimmunoanálisis (ELISA), comerciales o internos. Se han descrito pruebas de tipo ELISA indirecto, ELISA de bloqueo y ELISA doble, en las que se utilizan antígenos de los genotipos tanto de Tipo 1 como de Tipo 2, que permiten distinguir entre las*

reacciones serológicas a cada tipo. También existen ELISA comerciales que se han diseñado específicamente para la detección de seroconversión al VSRRP en líquidos bucales.

Requisitos para las vacunas: Las vacunas pueden ser de gran ayuda en la prevención o control de las formas disgenésica y respiratoria del SRRP. La vacunación con virus vivo modificado puede dar lugar a la excreción del virus vacunal en el esperma y a la transmisión vertical y horizontal entre cerdas y lechones o entre cerdos vacunados y no vacunados. Se han observado signos adversos inducidos por el virus vacunal. Las vacunas preparadas con virus vivos modificados pueden persistir en los rebaños vacunados. También existen vacunas con virus entero inactivado.

A. INTRODUCCIÓN

El síndrome reproductivo y respiratorio porcino (SRRP) se caracteriza por problemas en la reproducción de las cerdas y enfermedades respiratorias en los cerdos (revisión de Zimmerman *et al.*, 2012). El SRRP fue detectado por primera vez en 1987 en EE.UU., en 1989 en Japón y en 1990 en Alemania, y en pocos años se convirtió en una pandemia. Es una enfermedad causada por el virus del SRRP (VSRRP). Este síndrome fue descubierto en 1991 en los Países Bajos y en 1992 en EE.UU. (Zimmerman *et al.*, 2012) y está clasificado como miembro del orden de los Nidovirales, familia Arteriviridae, género *Arterivirus* (Faaberg *et al.*, 2012). El VSRRP es un virus de ARN de polaridad positiva y monocatenario, y la biología del virus está bien caracterizada. Además de los cerdos domésticos, los cerdos salvajes y los jabalíes, no se conoce ninguna otra especie que resulte infectada de forma natural por el VSRRP. Este virus no supone ningún riesgo zoonótico y no es infeccioso ni en el ser humano ni en células de origen humano. Poco después del descubrimiento del virus, se hizo evidente que las cepas europea y norteamericana constituyen dos genotipos bien diferenciados, el Tipo 1 y el Tipo 2, que también difieren antigénicamente (Zimmerman *et al.*, 2012). En estudios posteriores se ha observado que existen diferencias regionales dentro de cada continente. Estas diferencias empiezan a ser confusas dado que se ha introducido VSRRP tipo 2 en Europa y se ha descubierto virus tipo 1 en Norteamérica. La mayoría de las cepas de Sudamérica y gran parte de las de Asia son de tipo 2 y se considera que estos virus fueron introducidos por transportes de cerdos y/o de esperma. La mayor parte de virus de tipo 2 altamente virulentos del sureste asiático (VSRRP altamente patógeno) se caracteriza por supresiones de aminoácidos en la región NSP2 del genoma. No obstante, existen claros indicios experimentales de que estas supresiones no determinan la virulencia (Shi *et al.*, 2010a; Zhou *et al.*, 2010).

Cada vez existe más variedad de cepas de los dos genotipos, lo que se atribuye al alto índice de error inherente en la replicación del VSRRP y a la recombinación entre cepas (Murtaugh *et al.*, 2010). También existen descripciones de cepas del VSRRP de tipo 1 de Europa del este con un alto grado de polimorfismo, que proporcionan un conocimiento adicional acerca del surgimiento del agente patógeno relativamente nuevo de los cerdos. Se ha propuesto una distinción entre los subtipos 1, 2 y 3 dentro del Tipo 1. Asimismo, cada vez hay más indicios de que podría existir otro subtipo (subtipo 4) (Stadejek *et al.*, 2008; 2013). Son ampliamente conocidos los efectos de tal diversidad en los diagnósticos y en las vacunas, pero plantean un problema y deben tenerse en cuenta. Se ha observado que dos cepas, Lena, del subtipo 3, y Bor, del subtipo 2, tienen mayor virulencia que las cepas del subtipo 1 (Karniychuk *et al.*, 2010; Stadejek *et al.*, observaciones no publicadas). Trus *et al.* (2014) observaron que la vacuna viva modificada con el subtipo 1 protege parcialmente contra la cepa Lena del subtipo 3. Aunque se han identificado nueve linajes genéticos distintos en el VSRRP, el nivel general de diversidad dentro del tipo 2 no supera al observado en el del subtipo 1 (Shi *et al.*, 2010b; Stadejek *et al.*, 2013).

El síndrome reproductivo se reconoce por los abortos que causa en las últimas fases de la gestación y por los partos tempranos o retrasados en los que nacen fetos muertos o momificados, cerdos mortinatos y cerdos débiles. Se informa con frecuencia de un aumento de los reproductores que repiten durante la fase aguda de la epizootia. Ocasionalmente existen informes de fracasos reproductivos al inicio y a mitad de la gestación. Lo más probable es que la causa de los trastornos reproductivos relacionados con el VSRRP deriven de los efectos que ejerce el virus en la placenta y el endometrio (Karniychuk & Nauwynck, 2013). En verracos y en cerdas adultas jóvenes de reposición se pueden observar fiebre transitoria y anorexia. El síndrome respiratorio se reconoce por disnea (muy intensa), fiebre, anorexia y apatía. Los cerdos jóvenes resultan más afectados que los adultos, y los verracos y las cerdas (no preñadas) con frecuencia padecen infecciones subclínicas. Es frecuente un aumento de las infecciones secundarias y la mortalidad puede ser alta. Se ha descrito que en verracos infectados con el VSRRP y en los vacunados con la vacuna viva atenuada, el VSRRP puede aparecer en el esperma, lo que puede provocar cambios en la morfología y en la función del esperma (Christopher-Hennings *et al.*, 1997). El virus se transmite principalmente de forma directa por medio de los cerdos infectados y también por las heces, la orina y el esperma. También se puede transmitir por vectores insectos (moscas y mosquitos), e indirectamente, supuestamente por medio de aerosoles, lo cual conlleva una re-infección crónica de las zonas con densas poblaciones porcinas, y posiblemente por vectores mecánicos. Se han descrito bien las lesiones macroscópicas y microscópicas compatibles con la infección por VSRRP (Zimmerman *et al.*, 2012). En general, las lesiones son más graves en los animales más jóvenes que en los adultos. De acuerdo con las observaciones llevadas a cabo en el campo y estudios experimentales, se ha comprobado que existen diferencias de virulencia entre las cepas

de VSRRP dentro de un genotipo y entre genotipos (Karniychuk *et al.*, 2010; Weesendorp *et al.*, 2013). Esta variabilidad se ha reforzado con el surgimiento, en 2006, de un linaje de VSRRP en el sureste asiático asociado a una enfermedad porcina que cursaba con fiebre alta, un síndrome que causa una alta mortalidad en cerdos de todas las edades (Xiao *et al.*, 2014). Aunque desde el descubrimiento del VSRRP se han llevado a cabo muchos estudios de investigación, aún hay muchas lagunas en el conocimiento del vínculo que aparentemente existe entre el VSRRP y otras enfermedades, así como en la comprensión de la respuesta inmunitaria frente al VSRRP.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el síndrome reproductivo y respiratorio porcino y su propósito

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Identificación del agente¹						
Aislamiento del virus	–	++	–	+++	–	–
RT-PCR	+++	+++	+++	+++	++	–
IHC	–	–	–	++	–	–
ISH	–	–	–	++	–	–
Detección de respuesta inmunitaria²						
ELISA	+++	++	+++	++	+++	++
IPMA	++	++	++	+	++	+++
IFA	++	++	++	+	++	+++

Clave: +++ = método recomendado; ++ = método idóneo; + = puede utilizarse en algunas situaciones, pero el coste, la fiabilidad y otros factores limitan mucho su aplicación; – = no adecuado para este propósito.

Aunque no todas las pruebas clasificadas como +++ o ++ han sido validadas formalmente, su uso sistemático y el hecho de que se hayan utilizado ampliamente sin resultados dudosos las hace aceptables.

RT-PCR = reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa; IHC = inmunohistoquímica;

ISH = hibridación *in-situ*, ELISA = enzimoinmunoanálisis; IPMA = inmunoperoxidasa en monocapa,

IFA = inmunofluorescencia.

1. Identificación del agente

La identificación del VSRRP puede conseguirse mediante el aislamiento del virus, la detección de los ácidos nucleicos y la detección de proteínas víricas. Tras la infección, los cerdos desarrollan una viremia e infección pulmonar que pueden persistir durante semanas en los animales más jóvenes y días en los adultos, lo cual hace que las muestras de suero y los lavados pulmonares broncoalveolares sean ideales para detectar el VSRRP.

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

2 Es suficiente con una de las pruebas serológicas de la lista.

1.1. Aislamiento del virus

El aislamiento del VSRRP puede resultar difícil dado que no todas las cepas (especialmente de los virus de tipo 1) pueden infectar fácilmente células MARC-145 y CL-2621, que son clones derivados de la línea celular de riñón de mono MA-104 (Provost *et al.*, 2012; Zimmerman *et al.*, 2012). Estudios recientes muestran que los macrófagos derivados de monocitos porcinos también pueden utilizarse para el aislamiento y propagación del VSRRP en cultivo celular (García-Nicolás *et al.*, 2014). Estos pueden diferenciarse *in vitro* a partir de células mononucleadas de sangre periférica porcina (CMSP) sin sacrificar a los animales, contrariamente a lo que ocurre si se precisa pulmón para preparar macrófagos alveolares porcinos (MAP). Además, se han desarrollado varias líneas celulares modificadas genéticamente que permiten la replicación del VSRRP, como la línea de células MAP inmortalizada que expresa el antígeno CD163, células monomieloides porcinas inmortalizadas, células PK-15 que expresen el antígeno CD163 y sialoadhesina, así como células porcinas, felinas y de riñón de hámster neonato que expresen el antígeno CD163 (Delrue *et al.*, 2010; Provost *et al.*, 2012). Asimismo, se han descrito otras líneas celulares no recombinantes que también permiten la infección por el VSRRP (Feng *et al.*, 2013; Provost *et al.*, 2012). Los macrófagos alveolares porcinos (MAP) soportarán la replicación de casi todas, si no de todas, las cepas de VSRRP. Sin embargo la recogida de MAP no es una tarea fácil, dado que sólo los cerdos con un buen estado sanitario y con menos de 8 semanas de edad podrían utilizarse como fuente de MAP (Feng *et al.*, 2013). Los diferentes lotes de MAP no siempre son susceptibles por igual al VSRRP; de ahí que sea necesario analizar cada lote antes de usarlo. Se pueden guardar MAP en nitrógeno líquido hasta que sea necesario, como se describe más adelante. El aislamiento de VSRRP utilizando los MAP es una técnica que puede realizarse en la mayoría de laboratorios de diagnóstico. Esta técnica debe ser sensible para el aislamiento de todas las cepas de VSRRP y se explicará con detalle. Las muestras destinadas al aislamiento del virus deben refrigerarse a 4°C inmediatamente después de su obtención, y enviarse al laboratorio en un plazo máximo de 24–48 horas. La semivida del virus en el suero a esta temperatura se estima que es de 155 horas. No obstante, la infectividad se pierde rápidamente cuando el pH deja de situarse en el intervalo de 6,5-7,5 (Zimmerman *et al.*, 2012). Si las muestras deben guardarse durante más tiempo, se recomienda que se congelen a –70°C.

1.1.1. Obtención de macrófagos alveolares a partir de los pulmones

Los pulmones deben proceder preferentemente de cerdos SPF o de una piara de cerdos que se haya demostrado que está libre de la infección por VSRRP. Los mejores resultados se obtienen con cerdos de menos de 8 semanas de vida. Los macrófagos se deben obtener a partir del pulmón el mismo día del sacrificio del cerdo. Los pulmones deben lavarse tres o cuatro veces con un volumen total aproximado de 200 ml de solución salina estéril tamponada con fosfato (PBS). Posteriormente el líquido de lavado recogido se centrifuga a 300 **g** durante 10 minutos. El precipitado resultante que contiene los macrófagos se resuspende en PBS y se centrifuga (se lava) dos veces más. El precipitado final se resuspende en 50 ml de PBS, y se realiza un recuento del número de macrófagos para determinar la concentración celular. A continuación, los macrófagos pueden ser utilizados en fresco, o pueden conservarse en nitrógeno líquido según procedimientos estandarizados, a una concentración final de aproximadamente 6×10^7 macrófagos/vial de 1,5 ml. No deben mezclarse distintos lotes de macrófagos.

1.1.2. Comprobación de los lotes de macrófagos alveolares

Antes de poder utilizar un lote de macrófagos, este debe validarse. Debe realizarse titulando un VSRRP estándar con título conocido en los nuevos macrófagos, mediante una prueba de inmunoperoxidasa en monocapa (IPMA) con sueros que se sepa que son positivo y negativo, en placas inoculadas con estos nuevos macrófagos. Se considera que las células son adecuadas para ser usadas sólo si el VSRRP estándar crece hasta alcanzar su título específico (DICT₅₀ o dosis infectiva 50% en cultivo celular). Los macrófagos alveolares y el suero fetal bovino (FBS) empleados para suplementar los medios de cultivo deben estar libres de pestivirus.

1.1.3. Aislamiento/titulación del virus a partir de macrófagos alveolares

Los macrófagos alveolares se inoculan en los pocillos de fondo plano de placas de microtitulación para cultivo de tejidos. Tras la adhesión, los macrófagos se infectan con la muestra. Las muestras pueden ser suero o suspensiones de tejidos al 10%, tales como amígdalas, pulmón, ganglios linfáticos, y bazo. En general, el VSRRP provoca un efecto citopático (ECP) en los macrófagos después de 1–2 días de cultivo, pero a veces los virus producen un ECP casi inapreciable o sólo se observa tras pases sucesivos. Después de un período de 1–2 días o una vez que se observa el ECP, es preciso confirmar el VSRRP por inmunotinción con un antisuero o un anticuerpo monoclonal (MAb) específicos.

- i) Inoculación de los macrófagos en las placas de microtitulación
Se descongela un vial que contenga 6×10^7 macrófagos/1,5 ml. Se lavan las células una vez con 50 ml de PBS y la suspensión celular se centrifuga a 300 **g** durante 10 minutos (a temperatura ambiente). Se resuspenden las células en 40 ml de medio RPMI (Rose Memorial Institute) 1640 suplementado con glutamina al 1%, FBS al 10% y mezcla de antibióticos al 1–2 % (medio de crecimiento). Se dispensan 100 μ l de la suspensión celular en cada pocillo de la placa de microtitulación (con un vial de células, se pueden inocular cuatro placas de microtitulación a una concentración de 10^5 células en cada pocillo de las placas).
- ii) Preparación de las diluciones de la muestra (suero, suspensión de tejidos al 10%) en placas base
Se dispensan 90 μ l de medio de crecimiento en cada pocillo de una placa de microtitulación. Se añaden muestras de 10 μ l a los pocillos de las filas A y E (dilución 1/10 por duplicado). Se agitan las placas y se transfieren 10 μ l de las filas A y E a las filas B y F (dilución 1/100). Se agitan las placas y se transfieren 10 μ l de las filas B y F a las filas C y G (dilución 1/1.000). Se agitan las placas y se transfieren 10 μ l de las filas C y G a las filas D y H (dilución 1/10.000). Se agitan las placas. En el caso del aislamiento del virus sin titulación, es suficiente con diluciones de 1/10 y 1/100.
- iii) Incubación de las muestras
Se transfieren 50 μ l de las diluciones de la muestra de las placas de dilución a los correspondientes pocillos de la placa con macrófagos (primer pase). Se incuban 2–5 días y se comprueba diariamente si presentan ECP. El día 2, se inoculan macrófagos en placas de microtitulación nuevas (como se ha indicado previamente). Se transfieren 25 μ l de los sobrenadantes procedentes de las placas del primer pase a los pocillos correspondientes de las nuevas placas inoculadas (segundo pase). Tras incubación durante 2–5 días se comprueba a diario si presentan ECP.
- iv) Lectura e interpretación de los resultados
Los pocillos en los que los macrófagos presentan ECP sólo en el primer pase se considerarán falsos positivos debido a la toxicidad de la muestra. Los pocillos en los que los macrófagos presenten ECP en ambos pases o sólo en el segundo pase se considerarán como presuntos positivos. Todos los pocillos con monocapas de macrófagos que no muestren ECP tienen que identificarse como VSRRP negativos mediante inmunotinción con un antisuero o MAb positivo para el VSRRP. Las muestras que presenten ECP deben identificarse como positivas para el VSRRP mediante cultivo de las muestras de sobrenadante que presentan ECP, o diluciones de la muestra original, durante 24 y 48 horas en los macrófagos, y posterior inmunotinción con antisuero o MAb positivo para el VSRRP.
- v) Inmunotinción con un antisuero positivo para VSRRP o un MAb
Se infectan los macrófagos con 50 μ l de sobrenadante de la muestra de tejido como se describe en el apartado B.2.1., y se cultivan las células infectadas durante 24 y 48 horas. Se prepara la dilución apropiada de un suero positivo para el VSRRP en tampón de dilución, y se inmunotienen los macrófagos como se describe en los apartados B.2.1. o B.2.2.

1.2. Métodos de detección del ARN

Una de las técnicas de diagnóstico más utilizadas es la detección del ácido nucleico del VSRRP con la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), la RT-PCR anidada o la RT-PCR en tiempo real (Kleiboeker *et al.*, 2005; Wernike *et al.*, 2012a; 2012b). Las ventajas de la RT-PCR son que tiene una Especificidad y sensibilidad altas y que permite determinar rápidamente si la muestra está infectada. No obstante, no permite diferenciar el virus inactivado del virus infeccioso. Las pruebas basadas en la RT-PCR se suelen utilizar para detectar ácido nucleico en tejidos y suero. Se ha sugerido que el análisis de los líquidos bucales también da resultados fiables para un diagnóstico a nivel de rebaño (Kittawornrat *et al.*, 2010). Las pruebas mencionadas también son útiles cuando es problemático el aislamiento del virus, como por ejemplo cuando se analiza esperma (Christopher-Hennings *et al.*, 1997) y cuando se analizan tejidos parcialmente degradados por autólisis o por el calor durante el transporte de las muestras para el aislamiento de los virus. La mayor parte de protocolos internos y de kits actualmente a la venta permiten diferenciar entre cepas de los Tipos 1 y 2 (Kleiboeker *et al.*, 2005; Wernike *et al.*, 2012a; 2012b). Los falsos negativos debidos a la gran

diversidad genética, así como la falta de concordancia entre cebador y sonda son las principales preocupaciones a la hora de utilizar una RT-PCR. Actualmente, ninguna RT-PCR es capaz, por sí sola, de detectar todas las cepas del VSRRP, sobre todo los subtipos del Tipo 1 de Europa del este, de gran diversidad. Esta técnica también es propensa a la contaminación. Por lo tanto, a efectos de la interpretación, los resultados de la RT-PCR deben evaluarse con cautela, y es muy recomendable llevar a cabo una validación continua basada en las cepas del VSRRP que se encuentren recientemente en circulación (Wernike *et al.*, 2012a). Una técnica alternativa es la amplificación isotérmica mediada por bucle con transcripción inversa (RT-LAMP), que, a diferencia de la RT-PCR en tiempo real, no requiere de un equipo avanzado (Zimmerman *et al.*, 2012). Todas estas pruebas de detección de ácido nucleico son más rápidas que el aislamiento del virus y no requieren una infraestructura de cultivo celular.

Se ha desarrollado un análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de los productos amplificados por PCR, que se ha utilizado para diferenciar entre cepas naturales y vacunales del VSRRP (Zimmerman *et al.*, 2012) y se han llevado a cabo estudios epidemiológicos moleculares de cepas del VSRRP mediante el análisis filogenético de secuencias específicas de genes estructurales. No obstante, las altas tasas de recombinación que se observan en condiciones de campo pueden influir en los resultados del análisis filogenético que se basa en fragmentos de genoma cortos. Aunque rara vez se utiliza para el diagnóstico, con la hibridación *in-situ* se pueden detectar y diferenciar los tipos 1 y 2 del VSRRP en tejidos fijados en formalina. La sensibilidad y la especificidad de los métodos de detección del genoma del VSRRP pueden resultar comprometidos por la muy alta diversidad genética del VSRRP, sobre todo dentro del tipo 1. Para identificar proteínas víricas, puede utilizarse la inmunohistoquímica y, cuando se realiza en tejidos fijados en formalina, permite la visualización de antígenos junto y la de las lesiones histológicas (Zimmerman *et al.*, 2012).

2. Pruebas serológicas

Se han descrito varias pruebas para la detección de anticuerpos séricos contra el VSRRP. El diagnóstico serológico es, en general, fácil de realizar, y presenta una adecuada especificidad y sensibilidad a nivel de rebaño. En ocasiones el suero de cerdos individuales causa problemas por reacciones inespecíficas, pero esta dificultad se puede resolver tomando de nuevo muestras de la población de cerdos al cabo de 2–3 semanas. La serología se lleva a cabo generalmente mediante técnicas de unión, tales como la inmunoperoxidasa en monocapa (IPMA), la técnica de inmunofluorescencia (IFA), o la técnica del enzimoanálisis (ELISA) – de la cual se han descrito muchas variedades (Diaz *et al.*, 2012; Jusa *et al.*, 1996; Sorensen *et al.*, 1998; Venteo *et al.*, 2012; Yoon *et al.*, 1992). Estas pruebas se llevan a cabo habitualmente con antígeno vírico de un determinado genotipo, de modo que los anticuerpos dirigidos contra el otro genotipo, heterólogo, pueden ser detectados con menor sensibilidad. En Dinamarca se ha utilizado mucho un ELISA de bloqueo y se ha descrito como un sistema ELISA doble que emplea como antígeno tanto el virus de tipo 1 como el virus de tipo 2, y por tanto permite distinguir las reacciones serológicas contra cada uno de ambos tipos (Sorensen *et al.*, 1998). Esto tiene mucha importancia porque en Europa circulan cepas de Tipo 2 tras el uso de vacuna viva modificada con virus de Tipo 2 y debido a una introducción independiente (Stadejek *et al.*, 2013). También se ha descrito la identificación de las cepas de VSRRP de tipo 1 en Norteamérica y en Asia (Kleiboeker *et al.*, 2005; Zimmerman *et al.*, 2012). La prevalencia de las infecciones por virus de Tipo 2 en Europa y de las infecciones por virus de Tipo 1 en Norteamérica y en Asia no está bien documentada. Dado que ambos tipos de VSRRP están extendidos por todo el mundo, las pruebas serológicas deben contener antígenos de ambos tipos. Existen ELISA comerciales con buena sensibilidad y especificidad, y se han comparado entre ellos (Diaz *et al.*, 2012; Venteo *et al.*, 2012).

Los anticuerpos contra el virus pueden detectarse mediante técnicas de unión a un anticuerpo tan sólo 7–14 días después de la infección, y alcanzan sus títulos máximos a los 30–50 días. Algunos cerdos pueden convertirse en seronegativos en 3–6 meses, pero otros permanecen seropositivos durante mucho más tiempo. También se han detectado anticuerpos contra el VSRRP en trasudado de músculo y en líquido bucal. Aparecen anticuerpos neutralizantes lentamente y no alcanzan títulos elevados. Aparecen a partir de 3 ó 4 semanas tras la infección y persisten durante 1 año o más o bien quedan sin detectar. Se ha descrito el uso del complemento para aumentar la sensibilidad de la prueba de neutralización sérica del virus (Jusa *et al.*, 1996). Todavía no se ha investigado en profundidad la duración de los títulos de anticuerpos tras la infección, y probablemente los resultados dependerán de las pruebas realizadas. Los anticuerpos maternos tienen una semivida de 12–14 días, y su título puede, en general, detectarse hasta 4–8 semanas después del nacimiento, dependiendo del título de anticuerpos de la cerda en el parto y la prueba realizada. En un medio infectado, los cerdos nacidos de madres seropositivas pueden seroconvertir activamente a partir de las 3–6 semanas de vida.

Este capítulo describe con detalle el IPMA porque esta prueba se puede llevar a cabo fácilmente en laboratorios donde se hayan establecido los procedimientos de aislamiento de virus empleando macrófagos, y pueda ser utilizado con virus de ambos tipos antigénicos. Esta técnica también puede ser adaptada a la línea celular MARC-145, para ambos genotipos (Jusa *et al.*, 1996). Igualmente se ha diseñado una técnica de

inmunofluorescencia indirecta (IFA) empleando células MARC-145 para la serología del VSRRP y se incluye en el presente capítulo.

2.1. Detección de anticuerpos por la técnica de la inmunoperoxidasa en monocapa

Los macrófagos alveolares se inoculan en los pocillos de placas de microtitulación. Tras la adhesión, los macrófagos se infectan con el VSRRP. El objetivo es infectar aproximadamente el 30–50% de los macrófagos de un pocillo de modo que seamos capaces de distinguir sueros no específicos. Después de un periodo de incubación, los macrófagos se fijan y se emplean como sustrato celular para las pruebas serológicas. Un método alternativo es utilizar células MARC 145 en vez de macrófagos. En cada placa se pueden analizar 11 sueros por duplicado. Los sueros a analizar se diluyen e incuban sobre el sustrato celular. Si en el suero problema están presentes anticuerpos, se unirán al antígeno en el citoplasma de los macrófagos. En la siguiente etapa de incubación, los anticuerpos unidos se detectarán mediante un anticuerpo anti-especie conjugado a peroxidasa de rábano (HRP). Finalmente, el sustrato celular se incuba con una solución cromógeno/sustrato³. La lectura de la prueba se realiza mediante un microscopio invertido.

2.1.1. Inoculación de macrófagos en las placas de microtitulación

- i) Se descongela un vial que contenga 6×10^7 macrófagos/1,5 ml.
- ii) Se lavan las células una vez con 50 ml de PBS y la suspensión celular se centrifuga 10 minutos a 300 **g** (a temperatura ambiente).
- iii) Las células se introducen en 40 ml de medio RPMI 1640 suplementado con glutamina al 1%, FBS al 10%, 100 UI (Unidades Internacionales) de penicilina y 100 μ g de estreptomycin por ml (medio de crecimiento).
- iv) Se añaden 100 μ l de la suspensión celular a cada pocillo de una placa de microtitulación (con un vial de células, se pueden inocular cuatro placas a una concentración de 10^5 células en cada pocillo de las placas).
- v) Se incuban las placas 18–24 horas a 37°C en una incubadora con un 5% de CO₂, en condiciones de humedad. Como alternativa, se utiliza tampón HEPES (N-2-hidroxiethylpiperazina, ácido N-2-etanosulfónico) en el medio.

2.1.2. Infección de células con el VSRRP

- i) Se añaden a cada pocillo 50 μ l de una suspensión del virus que contenga 10^5 TCID₅₀/ml, pero se dejan dos pocillos sin infectar que actúen como controles.
- ii) Se incuban las placas 18–24 horas a 37°C en una incubadora con un 5% de CO₂.

2.1.3. Fijación de las células

- i) Se desecha el medio de cultivo y se lavan las placas una vez en solución salina.
- ii) Se golpean las placas suavemente sobre un papel absorbente para retirar el exceso de líquido y a continuación se secan (sin tapa) durante 45 minutos a 37°C.
- iii) Se congelan las placas (sin tapa) durante 45 minutos a –20°C. (Las placas que no se utilizan de inmediato para la prueba deben sellarse y guardarse a –20°C).
- iv) Se incuban las células durante 10 minutos a temperatura ambiente con paraformaldehído frío al 4% (en PBS). Como alternativa, las células podrían fijarse en etanol absoluto frío durante 45 minutos a 5°C o en acetona fría al 80% durante 45 minutos.
- v) Se desecha el paraformaldehído y se lavan las placas una vez en solución salina.

³ Preparación de la solución de cromógeno

Solución original de cromógeno (3-amino-9-etil-carbazol[AEC]): (a) 4 mg AEC; (b) 1 ml N, N-dimetil-formamida. Se disuelve (a) en (b) y se conserva la solución original AEC a 4°C en la oscuridad.

Preparación de la solución del cromógeno/sustrato (se prepara poco tiempo antes de usar)

Se prepara 0,05 M tampón acetato sódico, pH 5,0, como sigue: se disuelve 4,1 g de acetato sódico en 1 litro de agua destilada. Se ajusta el pH a 5,00 con ácido acético al 100%.

Se añade 1 ml de solución o AEC a 19 ml de 0,05 M tampón acetato sódico.

Se añaden 10 μ l de H₂O₂ al 30% por cada 20 ml de solución cromógeno/sustrato.

La solución se filtra por filtros de 5 μ m.

2.1.4. Preparación de diluciones séricas en una placa de dilución

- i) Se distribuyen 180 µl de NaCl 0,5 M con un 4% de suero equino y un 0,5% de Tween 80, pH 7,2 (tampón de dilución) a los pocillos de las filas A a E de la placa(s) base.
- ii) Se distribuyen 120 µl de tampón de dilución a todos los demás pocillos.
- iii) Se añaden 20 µl del suero problema o de los sueros control a los pocillos de las filas A y E (= dilución al 1/10), y se agitan.
- iv) Se diluyen los sueros a una cuarta parte transfiriendo 40 µl de las filas A y E a las filas B y F, y así sucesivamente para obtener posteriores diluciones de 1/40, 1/160 y 1/640.

2.1.5. Incubación de sueros en la placa con macrófagos fijados

- i) Se transfieren 50 µl de cada uno de los pocillos de la placa(s) base a los correspondientes pocillos de la placa con los macrófagos fijados. Se sella la placa(s) y se incuba durante 1 hora a 37°C.
- ii) Se desechan las diluciones séricas y se lava la placa(s) tres veces en NaCl 0,15 M + 0,5% de Tween 80.

2.1.6. Incubación con conjugado

- i) Se diluye el suero anti-porcino generado en conejo (o anti-ratón, si se tiñe la placa de aislamiento con MAb) y conjugado con HRPO a una dilución determinada en NaCl 0,15 M + 0,5% de Tween 80. Se añaden 50 µl de la dilución de conjugado a todos los pocillos de la placa(s). Se sella(n) la(s) placa(s) y se incuba(n) 1 hora a 37°C. Se lavan las placas tres veces.

2.1.7. Procedimiento de tinción

- i) Se distribuyen 50 µl de la solución de cromógeno/sustrato (AEC) filtrada a los pocillos de la(s) placa(s) (véase la nota 3 al pie).
- ii) Se incuba la AEC durante al menos 30 minutos a temperatura ambiente.
- iii) Se reemplaza la AEC por 50 µl de acetato de sodio 0,05 M, pH 5,0 (véase la nota 3 al pie).

2.1.8. Lectura e interpretación de los resultados

Si el suero problema contiene anticuerpos, el citoplasma de aproximadamente el 30–50% de las células del pocillo se teñirá de rojo intenso por el cromógeno. Un suero problema negativo se reconocerá por falta de tinción del citoplasma. Un suero que reacciona de forma inespecífica puede teñir todas las células del pocillo (si se compara con un suero control positivo). El título de un suero se expresa como el inverso de la mayor dilución que tiñe el 50% o más de los pocillos. Un suero con un título < 10 se considera negativo. Un suero con un título de 10 a 40 se considera débilmente positivo. A menudo se observa una tinción inespecífica en estas diluciones. Un suero con un título de ≥ 160 se considera positivo.

2.2. Detección de anticuerpos con la técnica de inmunofluorescencia indirecta

Aunque en la actualidad no existe una única técnica de inmunofluorescencia aceptada como estándar, se han desarrollado varios protocolos que utilizan diferentes laboratorios en Norte América. La IFA puede llevarse a cabo en placas de microtitulación o sobre portas de ocho cámaras empleando la línea celular MARC-145 y una cepa del VSRRP adaptado a dicha línea celular. Para evitar la reacción cruzada con pestivirus, se recomienda que las células y el FBS, para suplementar el medio de cultivo, estén libres de pestivirus. Tras un periodo de incubación, las células infectadas por VSRRP se fijan y se utilizan como sustrato celular para las pruebas serológicas. Las muestras de suero se analizan empleando una única dilución de detección, la 1/20, y serán consideradas positivas o negativas a esta dilución. Cada suero porcino que se ha de analizar se añadirá a los pocillos o las cámaras que contengan las células infectadas por el VSRRP. Si el suero contiene anticuerpos anti VSRRP, estos se unirán a los antígenos en el citoplasma de las células infectadas. Tras esta etapa se añade un anticuerpo anti-porcino-IgG conjugado a fluoresceína, el cual se unirá a los anticuerpos porcinos que estén unidos a los antígenos del VSRRP en las células infectadas. Para observar los resultados se emplea un microscopio de fluorescencia. Pueden emplearse también placas de microtitulación a fin de poder titular el suero (véase el apartado B.2.3, más adelante).

2.2.1. Inoculación e infección de las células MARC-145 en placas de microtitulación

- i) Se añaden 50 µl de un medio de cultivo celular (p ej. Medio Mínimo Esencial [MEM] que contenga L-glutamina 2 mM, piruvato sódico 1 mM, 100 UI de penicilina y 100 µg de estreptomina) sin FBS a cada pocillo de las columnas 2, 4, 6, 8, 10 y 12 de una placa de 96 pocillos utilizando un pipeteador multicanal.
- ii) Se emplean células confluentes MARC-145 tripsinizadas (cultivadas en frascos de cultivo) para inocular placas de microtitulación de 96 pocillos y se resuspenden las células en medio de cultivo que contenga FBS al 8% a una concentración de 100.000–125.000 células/ml. Las células MARC-145 se tripsinizan a partir de los frascos de cultivo para las pruebas IFA una vez a la semana, empleando tripsina/EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) y se inoculan en frascos de cultivo a una concentración de 250.000 células/ml. Tras 4 días en los frascos de cultivo, se añade medio de cultivo nuevo que contenga FBS al 2% manteniéndose tres días más
- iii) Utilizando un pipeteador multicanal, se añaden 150 µl de la suspensión celular a cada pocillo de la placa de 96 pocillos.
- iv) Se diluye la preparación de VSRRP en medio MEM sin FBS hasta $10^{2.2}$ DICT₅₀/50 µl y se distribuyen 50 µl en cada pocillo de las columnas, 1, 3, 5, 7, 8 y 11.
- v) Se incuban las placas durante unas 48-72 horas a 37°C en una incubadora humidificada con un 5% de CO₂ para obtener una monocapa con alrededor de un 40-50% de las células infectadas según se habrá determinado por inmunofluorescencia indirecta. Como alternativa, pueden inocularse primero placas de microtitulación con suspensiones de células MARC-145 (por ejemplo, a una concentración de 100.000 células/ml en medio suplementado con un 5-10% de FBS) e incubarse durante un máximo de 72 horas hasta que sean confluentes. A continuación, se añaden volúmenes de 50 µl de preparaciones de VSRRP (por ejemplo, 10^5 DICT₅₀/ml) por pocillo y las placas se incuban durante 48–72 horas más antes de la fijación. Se ha sugerido la utilización de tampones orgánicos como el HEPES en el medio para estabilizar el pH cuando no se dispone de incubadoras con CO₂.

2.2.2. Inoculación e infección de las células MARC-145 en portas de ocho compartimentos

- i) Se añaden 500 µl de una suspensión de células MARC-145 (p. ej. en MEM suplementado con FBS al 10%) a una concentración de 100.000 células/ml, a cada compartimento de un porta de ocho compartimentos.
- ii) Se incuban las células aproximadamente 48–72 horas a 37°C en una incubadora con atmósfera humidificada y un 5% de CO₂ hasta que confluyan.
- iii) Se añaden a cada cámara 50 µl de una suspensión del VSRRP que contenga 10^5 DICT₅₀/ml y después se incuban las células aproximadamente 18 horas a 37°C en una incubadora con atmósfera humidificada y un 5% de CO₂. En ese momento podrán observarse mediante inmunofluorescencia indirecta 15–20 células infectadas por campo de visión.

2.2.3. Fijación de las células

- i) Se elimina el medio, se lava una vez con PBS y se elimina el PBS. En el caso de portas de ocho compartimentos, se sacan las paredes de plástico de los compartimentos y se dejan intactas las gomas.
- ii) Se añaden volúmenes de 150 µl de acetona (al 80% en agua) fría (4°C) a cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Las placas se incuban 30 minutos a 4°C. En el caso de portas de ocho compartimentos, se emplea acetona (80–100%) a temperatura ambiente para fijar las células durante 10–15 minutos a temperatura ambiente. Algunas marcas comerciales de acetona pueden degradar las gomas de las cámaras dejando una película sobre los portas. Es recomendable comprobar la acetona antes de usarla para la fijación rutinaria
- iii) Se elimina la acetona y se secan las placas y portas a temperatura ambiente.
- iv) Las placas pueden introducirse entonces en bolsas de plástico, se sellan y se conservan a –70°C hasta su uso. Los portas de compartimentos pueden mantenerse de forma similar en estuches de portas.

2.2.4. Preparación de las diluciones de suero

- i) Se diluyen las muestras de suero hasta la dilución 1/20 en PBS (0,01 M; pH 7,2) en otras placas de 96 pocillos (p. ej. se añaden 190 µl de PBS empleando un pipeteador multicanal y seguidamente 10 µl de los sueros problema).
- ii) Se incluyen como controles de referencia sueros de título conocido, positivos con anticuerpos contra el VSRRP y negativos, sin ellos.

2.2.5. Incubación de sueros con células MARC-145 fijadas

- i) Se sacan las placas almacenadas en el congelador a -70°C y cuando alcanzan la temperatura ambiente, las células se rehidratan unos pocos minutos con 150 µl de PBS. Se quita el PBS invirtiendo las placas y se secan con toallas de papel. Las células en los portas de ocho compartimentos no se rehidratan.
- ii) De cada suero diluido se añaden volúmenes de 50 µl a un pocillo que contenga células no infectadas fijadas y a un pocillo que contenga células infectadas fijadas. Se añaden volúmenes similares de cada suero a cada compartimento de los portas.
- iii) De la misma manera se añaden volúmenes de 50 µl de diluciones de sueros control negativo y positivo.
- iv) Se incuban las placas tapadas a 37°C durante 30 minutos en una atmósfera húmeda. Los portas deben ser incubados de forma similar en cajas o bandejas de portas con tapadera.
- v) Se extraen las muestras de suero y las placas se secan sobre papel absorbente. Se debe realizar un total de seis lavados empleando 200 µl de PBS. El PBS se añade a cada pocillo y a continuación se invierten las placas para eliminar el PBS. Después de extraer las muestras de suero, los portas se lavan en PBS y a continuación se realiza un lavado de 10 minutos.

2.2.6. Incubación con el conjugado

- i) Mediante un pipeteador multicanal se añaden a cada pocillo volúmenes de 50 µl de suero de conejo o cabra anti-IgG porcina (cadenas ligeras y pesadas) diluido apropiadamente (en PBS preparado en el momento) y conjugado con ITCF (isotiocianato de fluoresceína). Volúmenes similares se añaden a los compartimentos individuales de los portas.
- ii) Se incuban las placas o los portas con sus tapaderas a 37°C durante 30 minutos en una atmósfera húmeda.
- iii) Se retira el conjugado de las placas y estas se secan sobre papel absorbente. Se realiza un total de cuatro lavados mediante PBS, como se ha descrito previamente. Tras desechar el conjugado de los portas, se aclaran con PBS, se lavan 10 minutos con PBS y se aclaran con agua destilada. Los portas se deben golpear suavemente sobre un papel absorbente para eliminar el exceso de agua.
- iv) Se observan las placas y los portas mediante un microscopio de fluorescencia.

2.2.7. Lectura e interpretación de los resultados

La presencia de fluorescencia verde en el citoplasma de las células infectadas combinada con la ausencia de tal señal en células no infectadas es un indicador de la presencia de anticuerpos contra el VSRRP en el suero a la dilución analizada. El grado de la intensidad de fluorescencia puede variar de acuerdo con la cantidad de anticuerpo específico anti-VSRRP presente en el suero problema.

La ausencia de fluorescencia verde específica en ambos tipos de células, infectadas y no infectadas, se interpreta como ausencia de anticuerpos contra el VSRRP en tal suero a la dilución utilizada. La prueba debe repetirse si en las células infectadas no se observa fluorescencia al utilizar el suero control positivo en células infectadas o si se observa la fluorescencia con el suero control negativo en células infectadas. No debe verse la fluorescencia en células no infectadas con ninguno de los sueros control. Cualquier suero problema que ofrezca resultados dudosos debe ser analizado de nuevo a la dilución 1/20 y si los resultados siguen sin ser claros, es necesario tomar una nueva muestra del mismo animal para su análisis posterior.

2.3. Evaluación mediante IFA de sueros para la titulación de anticuerpos

Para titular sueros también pueden emplearse placas de microtitulación y la técnica IFA. Se pueden titular hasta 16 sueros en cada placa de microtitulación de 96 pocillos.

2.3.1. Procedimiento analítico

- i) Se inoculan placas de microtitulación de 96 pocillos con células MARC-145 (a una concentración de 10^4 células por pocillo) o células MAP (unas 10^5 por pocillo) y se incuban a 37°C en una incubadora con atmósfera humidificada y un 5% de CO_2 hasta que confluyan.
- ii) Se inoculan todos los pocillos con la suspensión del VSRRP a una concentración ajustada para producir unos 100 focos de células infectadas por pocillo (para facilitar la lectura de los resultados) excepto los pocillos de las columnas 1, 6 y 11, y las placas se incuban a 37°C en una incubadora con atmósfera humidificada y un 5% de CO_2 durante 48–72 horas.
- iii) Se elimina el medio de cultivo y las monocapas se lavan una vez con PBS (0,01 M, pH 7,2). Las monocapas se fijan con acetona fría (solución acuosa al 80%) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se elimina la acetona, se secan al aire las placas y se mantienen tapadas a -20°C para almacenamientos cortos o a -70°C para almacenamientos a largo plazo, hasta su uso.
- iv) Se diluyen suero de forma seriada incluyendo un suero control positivo para el VSRRP utilizando una dilución en PBS a la cuarta parte, empezando por la dilución 1/16 o 1/20. Se diluye un suero control negativo a la dilución 1/16 o 1/20. Se distribuyen 50 μl de cada dilución (1/16, 1/64, 1/256, 1/1024 o 1/20, 1/80, 1/320, 1/1280) en los pocillos que contengan el antígeno vírico de las columnas 2, 3, 4, 5 o 7, 8, 9, 10. Para cada suero, también se distribuyen 50 μl de la dilución 1/16 o 1/20 en los pocillos control de las columnas 1 y 6. De la misma forma se distribuyen las diluciones de los sueros control positivo y negativo en los pocillos de las columnas 11 y 12.
- v) Las placas se incuban a 37°C durante 30 minutos en una cámara húmeda. Se desechan los sueros y se lavan las placas tres veces con PBS.
- vi) Se añaden 50 μl de suero anti IgG porcina, diluido apropiadamente, conjugado con ITCF y las placas se incuban a 37°C durante 30 minutos en una cámara húmeda. Se elimina el conjugado, y las placas se lavan varias veces y se golpean ligeramente sobre material absorbente para eliminar el exceso de líquido.

2.3.2. Lectura e interpretación de resultados

Tras el examen con un microscopio de fluorescencia, el título de un suero se define como el inverso de dilución más alta del suero a la que se observa la típica fluorescencia citoplasmática. Empleando muestras de suero pareadas, un incremento del título de cuatro veces con un intervalo de 2 semanas, es un indicativo de infección activa en un animal determinado. No se debe observar fluorescencia específica en células control no infectadas empleando sueros problema o sueros control positivo o negativo. Tampoco se debe observar fluorescencia en células infectadas usando suero control negativo. Debe aparecer fluorescencia específica en las células infectadas empleando suero control positivo a las diluciones apropiadas. El punto final del IFA puede variar entre laboratorios. Los resultados de las pruebas también pueden variar dependiendo de la cepa del VSRRP empleada en las pruebas, debido a la diversidad antigénica.

2.4. Detección de anticuerpos mediante enzoinmunoanálisis

El ELISA es una de las técnicas más utilizadas para la detección de anticuerpos específicos del VSRRP, y permite una confirmación rápida, específica y sensible de la exposición al virus. Varios laboratorios han desarrollado ELISA (indirectos o de bloqueos) para pruebas serológicas (Díaz *et al.*, 2012; Sorensen *et al.*, 1998; Venteo *et al.*, 2012). Se ha descrito un sistema ELISA doble-de bloqueo que permite distinguir entre reacciones serológicas frente a los tipos 1 y 2 (Sorensen *et al.*, 1998). En otro estudio se indica el desarrollo de un ELISA que permite diferenciar entre infecciones por el VSRRP de tipo 1 altamente patógeno e infecciones por el VSRRP de tipo 2 clásico (Xiao *et al.*, 2014). Se dispone de kits comerciales de ELISA para determinar el estado serológico de los cerdos frente al VSRRP, también a partir de líquidos bucales como matriz de diagnóstico (Kittawornrat *et al.*, 2010; Venteo *et al.*, 2012). En estos kits se emplean separadamente o bien de forma combinada los Tipos 1 y 2. La principal ventaja es el manejo rápido de gran número de muestras. También se han desarrollado y se venden ELISA que utilizan proteínas recombinantes de ambos tipos de VSRRP

como antígenos. Asimismo, se ha sugerido la posible aplicación de los ELISA que detectan las proteínas no estructurales NSP1, NSP2 y NSP7. Se observó que el rendimiento del ELISA que detecta la proteína NSP7 era comparable al de un kit comercial de ELISA. Además, permitió saber frente a qué tipo tenía lugar la respuesta humoral y resolvió un 98% de los falsos positivos que se habían obtenido con una prueba comercial (Brown *et al.*, 2009).

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

1. Antecedentes

1.1. Fundamentos y uso previsto del producto

En muchos países se comercializan vacunas vivas modificadas (MLV) y vacunas inactivadas (muertas) preparadas con VSRRP para el control de las formas reproductiva y/o respiratoria del SRRP (Murtaugh & Genzow, 2011). Se supone que la principal ventaja de la vacunación se produce cuando el virus de la vacuna está más estrechamente relacionado con el virus natural (Scorti *et al.*, 2006). No obstante, no existe ningún método que permita predecir la eficacia de la vacuna. Aunque la vacunación de los cerdos no evita la infección por el VSRRP, puede ser útil en explotaciones porcinas que experimenten problemas con el SRRP. Las vacunas muertas están autorizadas para su uso como ayuda a la reducción de abortos y de lechones débiles ocasionados por la forma reproductiva del SRRP. Las vacunas MLV han sido diseñadas para ser aplicadas a cerdas adultas y jóvenes 3–6 semanas antes de entrar en reproducción y en lechones de 3 semanas de edad o mayores para ayudar a reducir los trastornos provocados por el SRRP. Las vacunas MLV no están pensadas para ser utilizadas en rebaños que nunca antes hayan estado expuestos al virus, ni en verracos adultos. El virus de la vacuna puede persistir en verracos y puede ser diseminado a través del esperma (Christopher-Hennings *et al.*, 1997). El virus de la vacuna MLV puede ser excretado y transmitido por contacto a los cerdos no vacunados o verticalmente a la descendencia (Zimmerman *et al.*, 2012). Se están desarrollando vacunas mediante ingeniería genética, pero todavía no están a la venta. Las directrices a seguir para la producción de vacunas de interés veterinario se indican en el capítulo 1.1.8 *Principios de producción de vacunas veterinarias*. Las normas dadas aquí y en el capítulo 1.1.8 intentan ser de naturaleza genérica y pueden ser suplementadas con requisitos nacionales o regionales.

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

2.1. Características del inóculo

2.1.1. Características biológicas

La cepa del VSRRP utilizada en la producción de vacunas debe ir acompañada de una ficha donde se describa su origen e historial de pases. El virus del inóculo original (MSV) debe ser inocuo en cerdos de la edad prevista de vacunación y proporcionar protección frente al virus de desafío. Se debe demostrar que las cepas utilizadas para las vacunas MLV no revierten a su estado virulento tras pasarlas por animales hospedadores.

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

El MSV debe estar libre de bacterias, hongos y micoplasmas. Mediante técnicas con anticuerpos fluorescentes, debe demostrarse que el MSV está libre de virus extraños, incluyendo el virus de la gastroenteritis transmisible, el coronavirus respiratorio porcino, el virus de la diarrea epidémica porcina, el adenovirus porcino, el circovirus porcino tipos 1 y 2, el virus de la encefalitis hemoaglutinante porcina, el parvovirus porcino, el virus de la diarrea vírica bovina, reovirus, y el virus de la rabia. El MSV debe estar libre de virus extraños según comprobación del ECP y la hemadsorción en la línea celular Vero y en un tipo celular porcino embrionario.

2.2. Método de fabricación

2.2.1. Procedimiento

El VSRRP se propaga en una línea celular continua, como la línea MARC-145 (clon de MA-104). La propagación vírica no debe exceder de cinco pases desde el virus del inóculo original (MSV) a menos que pases posteriores demuestren proporcionar protección en el ganado porcino.

La línea celular se siembra en recipientes adecuados. Se utiliza MEM suplementado con FBS como medio para la producción. Se inoculan cultivos celulares directamente con stock de virus de trabajo del SRRP, que en general tiene 1 a 4 pases desde el MSV. Los cultivos inoculados se incuban 1-8 días antes de recoger el medio de cultivo. Durante la incubación, se comprueba a diario si los cultivos presentan ECP o contaminación bacteriana.

Las vacunas de virus muertos se inactivan químicamente con formalina o etilenimina binaria y se mezclan con un adyuvante adecuado. Las vacunas MLV se mezclan generalmente con un estabilizador antes de ser envasadas y liofilizadas. Si se emplea formalina como inactivador, debe comprobarse que en el producto final la concentración residual de formaldehído no exceda de 0,74 g/l.

2.2.2. Requisitos para los sustratos y los medios

El FBS debe estar libre de pestivirus o anticuerpos anti pestivirus y no debe comportar riesgo de encefalopatía espongiiforme bovina.

2.2.3. Controles durante el proceso

Los lotes de VSRRP para producción de vacuna MLV y de vacunas con virus inactivado (muerto) deben titularse en cultivo tisular para estandarizar el producto. Los lotes de títulos bajos pueden concentrarse o mezclarse con lotes de títulos altos para lograr el título correcto.

2.2.4. Pruebas en lotes de product final

Se comprueba la pureza, inocuidad y potencia en muestras del recipiente final. También se toman viales de MLV para comprobar si cumplen el contenido en humedad máximo permitido.

i) Esterilidad y pureza

Se toman muestras para comprobar si presentan contaminación bacteriana, fúngica o por pestivirus. Para comprobar si una vacuna MLV contiene bacterias, se inoculan diez recipientes, cada uno de los cuales debe contener 120 ml de medio hidrolizado de caseína de semilla de soja, con 0,2 ml procedentes de 10 muestras de contenedores finales. Los diez recipientes se incuban a 30–35°C durante 14 días y se realiza un seguimiento del posible crecimiento bacteriano. Para comprobar si contienen hongos se inoculan 10 recipientes, cada uno de ellos con 40 ml de medio hidrolizado de caseína de semilla de soja, con 0,2 ml procedentes de 10 muestras de los contenedores finales. Los recipientes se incuban a 20–25°C durante 14 días y se observa el posible crecimiento de hongos. Las vacunas muertas requieren la inoculación de 1,0 ml de muestras de diez recipientes finales en los diez recipientes de medios adecuados. Debe comprobarse si se ha producido contaminación por pestivirus con arreglo a las directrices que se establecen en los capítulos 1.1.9 *Pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación en los materiales biológicos de uso veterinario* y capítulo 2.8.3. *Peste porcina clásica (cólera porcina)*.

ii) Inocuidad

Pueden llevarse a cabo pruebas de inocuidad con una combinación de cobayas, ratones o cerdos.

iii) Potencia del lote

Se titulan muestras del contenedor final de una vacuna MLV (\log_{10}) en placas de microtitulación para determinar el título.

a) Procedimiento analítico

- i) Se preparan diluciones decimales partiendo de 10^{-1} hasta 10^{-5} empleando 0,2 ml de la vacuna problema rehidratada y 1,8 ml de MEM. Debe titularse un control positivo interno del VSRRP en el intervalo apropiado.
- ii) Se inocula 0,1 ml/pocillo de cada dilución en cinco pocillos de una placa con 96 pocillos que contengan monocapas.
- iii) Se incuba la placa a 37°C en una atmosfera con CO₂ durante 5–7 días.
- iv) Se observan las placas microscópicamente para comprobar si presentan ECP. El control positivo interno del VSRRP debe dar un título situado en un intervalo de 0,3 log₁₀ DICT₅₀ desde su media predeterminada.
- v) Se determina la DICT₅₀/dosis mediante el método de Spearman–Kärber. El título de expedición obtenido debe ser al menos 1,2 logs mayor que el título utilizado en la prueba de inmunogenicidad. Los 1,2 logs incluyen 0,5 logs para estabilidad durante todo el periodo de validez del producto y 0,7 logs para la variabilidad de la prueba de potencia.

Para determinar la potencia del producto final en las vacunas con virus muerto se pueden utilizar pruebas de vacunación del animal hospedador o de animales de laboratorio, o bien pruebas serológicas, así como pruebas de vacunación/desafío. Las pruebas en paralelo empleando técnicas tipo ELISA que cuantifican antígeno para comparar un estándar con el producto final son adecuados para determinar la potencia comparativa de un producto. Debe demostrarse que estándar proporciona protección al animal hospedador.

2.3. Requisitos para la autorización

2.3.1. Requisitos de inocuidad

- i) Inocuidad en especies de destino y no de destino

Deben llevarse a cabo pruebas de campo para determinar la inocuidad de la vacuna. En cada una de ellas deben incluirse cerdos centinela no vacunados para realizar un seguimiento de la excreción del virus atenuado.

- ii) Reversión a la virulencia en vacunas atenuadas/vivas

Debe demostrarse que el MSV no revierte a la virulencia tras varios pases en animales hospedadores, aunque la definición de virulencia con este tipo de virus es difícil. Se sabe que ciertas cepas del VSRRP causan viremia y se transmiten a animales susceptibles. Debe demostrarse que el MSV es avirulento en lechones destetados y animales gestantes tras cinco pases seriados (hasta diez pases según el país) del MSV por animales porcinos susceptibles utilizando la vía de infección más natural.

- iii) Consideraciones medioambientales

No es aplicable.

2.3.2. Requisitos de eficacia

- i) Para la producción animal

En una prueba de inmunogenicidad, el MSV al máximo nivel de pases destinado a producción debe proteger cerdos susceptibles frente a una cepa virulenta de desafío no relacionada. En el caso de la forma respiratoria, se vacunan lechones de 3 semanas de edad con el máximo nivel de pases del MSV. Los lechones se exponen a alrededor de 10^5 DICT₅₀ de una cepa virulenta del VSRRP 2 a 16 semanas después para determinar si están protegidos frente a los signos clínicos respiratorios del SRRP. Para determinar la protección frente a las pérdidas causadas por la forma reproductiva del SRRP, se exponen animales vacunados aproximadamente a los 85 días de gestación. En los animales vacunados, a partir de los signos clínicos de enfermedad reproductiva, como momificación fetal y lechones nacidos muertos y/o débiles, se determina el porcentaje de prevención, es decir, la parte de casos de SRRP potencialmente prevenidos gracias a la vacunación, con el fin de determinar si se produce una protección aceptable, teniendo en cuenta lo indicado en la etiqueta del producto, por comparación con los animales control.

Se llevan a cabo estudios sobre la duración de la inmunidad antes de que la vacuna reciba la autorización final. En el caso de la forma respiratoria del SRRP, debe

demostrarse que la inmunidad dura hasta que los cerdos alcanzan la edad de sacrificio. En el caso de la forma reproductiva, la inmunidad debe durar hasta el destete.

- ii) Para el control y la erradicación
No es aplicable.

2.3.3. Estabilidad

A todas las vacunas se asigna inicialmente un periodo de validez de 24 meses. A continuación, se llevan a cabo estudios de estabilidad en tiempo real para confirmar si la fecha de caducidad es adecuada.

Deben titularse múltiples lotes de vacunas MLV periódicamente a lo largo de todo el periodo de validez, con el fin de determinar la variabilidad de la vacuna. Si los títulos no son suficientes o son muy variables, debe ajustarse el valor de expedición.

Las vacunas muertas en las que se utilizan pruebas de potencia *in-vivo* deben volver a analizarse en el momento de la caducidad para comprobar si siguen estables. Debe comprobarse la estabilidad del estándar mediante pruebas paralelas con técnicas de cuantificación del antígeno con ELISA.

3. Vacunas desarrolladas mediante ingeniería genética

3.1. Vacunas existentes y sus ventajas

Están en desarrollo, pero todavía no se comercializan.

3.2. Requisitos especiales para las vacunas desarrolladas mediante ingeniería genética, si las hay

Todavía no es aplicable.

BIBLIOGRAFÍA

BROWN E., LAWSON S., WELBON C., GNANANDARAJAH J., LI J., MURTAUGH M.P., NELSON E.A., MOLINA R.M., ZIMMERMAN J.J., ROWLAND R.R. & FANG Y. (2009). Antibody response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) nonstructural proteins and implications for diagnostic detection and differentiation of PRRSV types I and II. *Clin. Vaccine Immunol.*, **16**, 628–635.

CHRISTOPHER-HENNINGS J., NELSON E.A., NELSON J.K. & BENFIELD D.A. (1997). Effects of a modified-live virus vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome in boars. *Am. J. Vet. Res.*, **58**, 40–45.

DEL RUE I., VAN GORP H., VAN DOORSSELAERE J., DELPUTTE P.L. & NAUWYNCK H.J. (2010). Susceptible cell lines for the production of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by stable transfection of sialoadhesin and CD163. *BMC Biotechnol.*, **29**, 48.

DÍAZ I., VENDEO A., REBOLLO B., MARTÍN-VALLS G.E., SIMON-GRIFÉ M., SANZ A. & MATEU E. (2012). Comparison of two commercial enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **24**, 344–348.

FAABERG K.S., BALASURIYA U.B., BRINTON M.A., GORBALENYA A.E., LEUNG F.C.-C., NAUWYNCK H., SNIJDER E.J., STADEJEK T., YANG H. & YOO D. (2012). Arteriviridae. *In: Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B. & Lefkowitz E.J. Elsevier Academic Press, San Diego, USA, 796–805.

FENG L., ZHANG X., XIA X., LI Y., HE S. & SUN H. (2013). Generation and characterization of a porcine endometrial endothelial cell line susceptible to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res.* **171**, 209–215.

GARCÍA-NICOLÁS O., BAUMANN A., VIELLE N.J., GÓMEZ-LAGUNA J., QUEREDA J.J., PALLARÉS F.J., RAMIS G., CARRASCO L. & SUMMERFIELD A. (2014). Virulence and genotype-associated infectivity of interferon-treated macrophages by porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *Virus Res.*, **179**, 204–211.

- JUSA E.R., INABA Y., KOUNO M., HIROSE O., SHIBATA I., KUBOTA M. & YASUHARA H. (1996). Slow-reacting and complement-requiring neutralizing antibody in swine infected with porcine reproductive and respiratory (PRRS) virus. *J. Vet. Med. Sci.*, **58**, 749–753.
- KARNIYCHUK U.U., GELDHOF M., VANHEE M., VAN DOORSSELAERE J., SAVELEVA T.A. & NAUWYNCK H.J. (2010). Pathogenesis and antigenic characterization of a new East European subtype 3 porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate. *BMC Vet. Res.*, **4**, 30.
- KARNIYCHUK U.U. & NAUWYNCK H.J. (2013). Pathogenesis and prevention of placental and transplacental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Vet. Res.*, **44**, 95.
- KITTAWORNAT A., PRICKETT J., CHITTICK W., WANG C., ENGLE M., JOHNSON J., PATNAYAK D., SCHWARTZ T., WHITNEY D., OLSEN C., SCHWARTZ K. & ZIMMERMAN J. (2010). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in serum and oral fluid samples from individual boars: will oral fluid replace serum for PRRSV surveillance? *Virus Res.*, **154**, 170–176.
- KLEIBOEKER S.B., SCHOMMER S.K., LEE S.M., WATKINS S., CHITTICK W. & POLSON D. (2005). Simultaneous detection of North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome virus using real-time quantitative reverse transcriptase-PCR. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **17**, 165–170.
- MURTAUGH M.P. & GENZOW M. (2011). Immunological solutions for treatment and prevention of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). *Vaccine*, **26**, 8192–8204.
- MURTAUGH M.P., STADEJEK T., ABRAHANTE J.E., LAM T.T. & LEUNG F.C. (2010). The ever-expanding diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res.*, **154**, 18–30.
- PROVOST C., JIA J.J., MUSIC N., LÉVESQUE C., LABEL M.È., DEL CASTILLO J.R., JACQUES M. & GAGNON C.A. (2012). Identification of a new cell line permissive to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection and replication which is phenotypically distinct from MARC-145 cell line. *Virol. J.*, **13**, 267.
- SCORTTI M., PRIETO C., MARTINEZ-LOBO F.J., SIMARRO I. & CASTRO J.M. (2006). Effects of two commercial European modified-live vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome viruses in pregnant gilts. *Vet. J.*, **172**, 506–514.
- SHI M., LAM T.T., HON C.C., HUI R.K., FAABERG K.S., WENNBLOM T., MURTAUGH M.P., STADEJEK T. & LEUNG F.C. (2010a). Molecular epidemiology of PRRSV: a phylogenetic perspective. *Virus Res.*, **154**, 7–17.
- SHI M., LAM T.T., HON C.C., MURTAUGH M.P., DAVIES P.R., HUI R.K., LI J., WONG L.T., YIP C.W., JIANG J.W. & LEUNG F.C. (2010b). Phylogeny-based evolutionary, demographical, and geographical dissection of North American type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *J. Virol.*, **84**, 8700–8711.
- SORENSEN K.J., STRANDBYGAARD B., BØTNER A., MADSEN E.S., NIELSEN J. & HAVE P. (1998). Blocking ELISAs for the distinction between antibodies against European and American strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Microbiol.*, **60**, 169–177.
- STADEJEK T., OLEKSIEWICZ M.B., SCHERBAKOV A.V., TIMINA A.M., KRABBE J.S., CHABROS K. & POTAPCHUK D. (2008). Definition of subtypes in the European genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: nucleocapsid characteristics and geographical distribution in Europe. *Arch. Virol.*, **153**, 1479–1488.
- STADEJEK T., STANKEVICIUS A., MURTAUGH M.P. & OLEKSIEWICZ M.B. (2013). Molecular evolution of PRRSV in Europe: current state of play. *Vet. Microbiol.*, **26**, 21–28.
- TRUS I., BONCKAERT C., VAN DER MEULEN K. & NAUWYNCK H.J. (2014). Efficacy of an attenuated European subtype 1 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine in pigs upon challenge with the East European subtype 3 PRRSV strain Lena. *Vaccine*, **32**, 2995–3003.
- VENTEO A., REBOLLO B., SARRASECA J., RODRIGUEZ M.J. & SANZ A. (2012). A novel double recognition enzyme-linked immunosorbent assay based on the nucleocapsid protein for early detection of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *J. Virol. Methods.*, **181**, 109–113.
- WEESENDORP E., MORGAN S., STOCKHOFE-ZURWIEDEN N., POPMA-DE GRAAF D.J., GRAHAM S.P. & REBEL J.M. (2013). Comparative analysis of immune responses following experimental infection of pigs with European porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains of differing virulence. *Vet. Microbiol.*, **12**, 1–12.

WERNIKE K., BONILAUDI P., DAUBER M., ERRINGTON J., LEBLANC N., REVILLA-FERNÁNDEZ S., HJULSAGER C., ISAKSSON M., STADEJEK T., BEER M. & HOFFMANN B. (2012a). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: interlaboratory ring trial to evaluate real-time reverse transcription polymerase chain reaction detection methods. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **24**, 855–866.

WERNIKE K., HOFFMANN B., DAUBER M., LANGE E., SCHIRRMIEER H. & BEER M. (2012b). Detection and typing of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus by multiplex real-time rt-PCR. *PLoS One.*, **7**, 38251.

XIAO Y.H., WANG T.T., ZHAO Q., WANG C.B., LV J.H., NIE L., GAO J.M., MA X.C., HSU W.H. & ZHOU E.M. (2014). Development of Indirect ELISAs for Differential Serodiagnosis of Classical and Highly Pathogenic Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Transbound. Emerg. Dis.*, **61**, 341–349.

YOON I.J., JOO H.S., CHRISTIANSON W.T., KIM H.S., COLLINS J.E., MORRISON R.B. & DIAL G.D. (1992). An indirect fluorescent antibody test for the detection of antibody to swine infertility and respiratory syndrome virus in swine sera. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **4**, 144–147.

ZHOU L. & YANG H. (2010). Porcine reproductive and respiratory syndrome in China. *Virus Res.* **154** (1–2), 31–37.

ZIMMERMANN J.J., BENFIELD D.A., DEE S.A., MURTAUGH M.P., STADEJEK T., STEVENSON G.W. & Torremorel M. (2012). Porcine reproductive and respiratory syndrome Virus (Porcine Arterivirus). *In: Diseases of Swine*, Tenth Edition, Zimmerman J.J., Karriker L.A., Ramirez A., Schwartz K.J., Stevenson G.W. eds. Iowa State University Press. Ames, Iowa, USA, 461–486.

*
* *

NB: Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para el Síndrome reproductivo y respiratorio porcino (puede consultarse la lista más actualizada en la Tabla de la Parte 4 de este *Manual Terrestre* o en la página web de la OIE: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Por favor, contacte con el Laboratorio de Referencia de la OIE para cualquier otro dato sobre las pruebas de diagnóstico, los reactivos y las vacunas para el síndrome reproductivo y respiratorio porcino.

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1996; ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2015.