

DIAGNÓSTICO DEL VIRUS DE LA INFLUENZA PORCINA EN HATOS DE CERDOS

Robyn Fleck DVM
Intervet/Schering-Plough Animal Health

Introducción

La influenza porcina (SIV, por sus siglas inglés) es una enfermedad viral aguda de los cerdos caracterizada por fiebre alta, depresión, tos, descarga nasal clara y dificultad para respirar. En hatos no infectados (susceptibles), las infecciones de influenza se mueven rápidamente a través de una población y van a infectar a una alta porción de los cerdos. Los signos clínicos usualmente van a desaparecer en el lapso de una semana a menos que una infección bacteriana secundaria se establezca, causando una neumonía crónica. Otros virus como el PRRS (por sus siglas en inglés) y PVC2 (por sus siglas en inglés) pueden co-infectar a los cerdos con el SIV, causando neumonías mixtas severas. La fiebre alta característica asociada con SIV puede causar abortos y nacidos muertos en los vientres. Las hembras lactantes afiebradas tendrán un consumo de alimento pobre y fallarán en la crianza efectiva de los lechones. Los berracos con fiebre pueden disminuir la producción de semen. En los cerdos en finalización, la fiebre alta y la neumonía frenarán la tasa de ganancia, teniendo como resultado un aumento de 7 a 14 días al mercado.

Variaciones antigénicas

La hemoaglutinina (HA) es una glicoproteína que se encuentra afuera del virus de la influenza. Se une a los receptores en las células de recubrimiento del tracto respiratorio y es un factor crítico de virulencia. Cuando el huésped tiene una buena respuesta inmune a la HA, estará protegido contra la infección. Hay 15 tipos diferentes de HA. La neuroaminidasa (NA) también se encuentra en la parte de afuera del virus. Ella le ayuda al virus a escapar de las células del huésped durante la replicación. Hay 8 diferentes tipos de NA. Los virus de la influenza se sub-tipifican de acuerdo a su HA y NA, p.e., H1N1, H5N7.

El SIV es un virus ARN y es propenso a errores genéticos durante la replicación. Estos errores dan como resultado mutaciones, que resultan en cambios en la estructura en las proteínas virales. A veces estas mutaciones cambian la estructura de las proteínas en sitios antigénicos importantes, por lo tanto permitiendo que el virus evada el sistema inmune de los cerdos. Esto se llama variación antigénica. La variación antigénica puede tener como resultado dificultades en el diagnóstico con la prueba de inhibición de la hemaglutinación (HI, por sus siglas en inglés) y en la prueba de ELISA IDEXX.

Recombinación genética

Los virus de la influenza tienen genomas segmentados lo que quiere decir que la cadena de material genético (ARN) para las proteínas virales no está en una línea larga en vez de ellos, está en piezas separadas. El SIV tiene ocho segmentos de ARN separados y no unidos. Cada segmento codifica una parte diferente del virus. El genoma segmentado habilita virus de influenza separados que infecta a una misma célula al mismo tiempo para incluir segmentos del material genético de cada uno en la descendencia de los virus. Este proceso, llamado recombinación viral, crea virus completamente nuevos. A veces estos virus recombinados tienen propiedades diferentes y puede causar enfermedad severa en un hato susceptible. Esto es lo que pasó en 1998 cuando un virus H3N2 recombinante triple apareció y se diseminó a través del hato porcino de EUA. Estos virus "recombinantes triples" tienen segmentos de genes de aves, humanos y cerdos. Ya que los hatos no tenían inmunidad contra este nuevo virus, se diseminó rápidamente y creó una enfermedad clínica severa. Este efecto es llamado variación antigénica. La introducción de un nuevo subtipo H o N a una población puede hacer el diagnóstico difícil y se puede requerir el uso de nuevos cebadores para la PCR en tiempo real o el uso de aislamientos de virus de campos nuevos para la prueba de HI.

Dinámica de la infección con SIV

La infección y replicación del SIV en el huésped es un proceso rápido, como lo es la limpieza del virus por huésped. Después de la exposición, el periodo de incubación es como de 24 horas, en el cual el momento del pico de la fiebre se presenta. A las 48 horas, un gran número de virus son excretados del los pasajes nasales y los pulmones. Después de este tiempo, el sistema inmune innato responde y comienza la limpieza del virus. La excreción del virus virtualmente no existe para el día 5-7 después de la infección. La seroconversión en un animal susceptible puede ser detectada dentro los 10-14 días después de la infección. Si el animal ha sido previamente iniciado vía vacunación o exposición viral, la seroconversión puede presentarse mucho más rápidamente, dentro de 4-7 días.

Diagnóstico del SIV

Hay tres principales metas para diagnosticar SIV. La primera es determinar si el SIV ha entrado a un hato susceptible y determinar que cepa puede ser para crear un programa de vacunación. La segunda metas es determinar si una nueva cepa ha entrado a un hato previamente infectado y determinar si el programa de vacunación necesita ser alterado. No es inusual que un hato esté infectado con múltiples serotipos, para los cuales puede haber poca inmunidad compartida. Finalmente, la tercera meta es determinar el efecto del SIV en un hato que se sabe positivo en los cerdos en crecimiento. Este tipo de hatos típicamente presentan una infección con SIV crónica de grado bajo en los cerdos en iniciación o a si mismo un brote definido, fácil de predecir en los cerdos en finalización.

Signos clínicos

El diagnóstico del SIV a través de los signos clínicos no es enteramente confiable aunque diferentes algunos si siguen ciertos patrones de presentación clínica. Un episodio agudo en un hato susceptible se caracteriza por casi el 100 % de animales (ambos, adultos y jóvenes) con fiebre alta, descarga nasal clara, depresión y tos. Sin embargo, los diagnósticos diferenciales se deben incluir neumonía por *Mycoplasma hyopneumoniae* (M. hyo) con co-infección bacteriana, Pseudorrabia (PRV) y Fiebre porcina Clásica (CSF, por sus siglas en inglés).

Un hato en que los adultos tienen inmunidad y los cerdos jóvenes tienen inmunidad pasiva que se acabará en cierto momento se denomina como hato “crónico”. Este hato típicamente presenta enfermedad respiratoria de bajo grado con o sin estornudos en la fase de iniciación. El hato “crónico” también puede presentar un brote confiable en cada grupo que entra en la finalización temprana. El diagnóstico del SIV crónico en la iniciación puede ser desafiante ya que los signos clínicos son frecuentemente no tan severos y no afectan una alta proporción de la población en un mismo momento. Los diagnósticos diferenciales para fiebre, tos, estornudos y letargia en cerdos jóvenes incluyen PRRS, PRV, *Hemophilus parasuis*, migración de Ascáridos, *Bordetella bronchiseptica*, APP y M. hyo. Si la enfermedad se presenta como un brote definido en la fase de finalización, puede ser más fácil de detectar. Un factor de confusión es que el SIV puede estar presente en esta población a un nivel bajo y no causar ningún signo clínico.

La introducción de un virus nuevo a un hato previamente vacunado puede tener una presentación clínica única. Frecuentemente los adultos tendrán signos clínicos sutiles pero los lechones lactantes estornudarán y toserán. Esto es en contraste con los hatos crónicos en los que el SIV se muestra al final de la iniciación o comienzo de la finalización. El diagnóstico diferencial para las enfermedades respiratorias en lechones lactantes debe incluir citomegalovirus, *Bordetella bronchiseptica*, rinitis atrófica y PRRS.

Necropsia y Envío de Muestras

Idealmente, los cerdos clínicamente enfermos, afectados agudamente, deben ser sacrificados y sus tejidos enviados para la tinción de histopatología e inmunohistoquímica (IHC, por sus Siglas en inglés). La infección por SIV produce lesiones microscópicas características de bronquiolitis necrótica e infiltración perivascular por linfocitos. Si se usa IHC el antígeno viral se encontrará en las células epiteliales o en los desechos necróticos.

Es importante enviar cerdos afectados agudamente debido a la dinámica del daño a nivel tisular. El daño epitelial se puede ver a los tres días después de la infección. La reparación epitelial proliferativa empezará para el día 7 en las vías aéreas mayores y el daño epitelial se habrá resuelto para el día 14. Por ello, el antígeno viral detectado por la IHC estará ausente para el día 14 y la neumonía estará resuelta para el día 21 después de la infección.

En los cerdos afectados agudamente, el fluido de un lavado broncoalveolar puede recolectarse antes de disecar los pulmones. Infunda 20 ml de solución salina estéril en la traquea, masaje los pulmones y después invierta los pulmones y la traquea sobre un tubo con tapa para recolectar el fluido. Este fluido puede ser analizado con la prueba PCR de transcriptasa reversa (RT) para la presencia del ARN del SIV.

Durante un brote agudo, se deben recolectar hisopos nasales de cerdos clínicamente enfermos. Idealmente, los cerdos deben ser sujetos en una trampa y determinar su temperatura con un termómetro. Los cerdos con temperatura por arriba de los 40.5 °C son buenos candidatos para la necropsia y para los hisopos nasales. Los hisopos nasales deben hacerse con fibra sintética, no con algodón. El exterior de la nariz debe limpiarse para quitar la contaminación macroscópica y el hisopo insertarse lo más que se pueda mientras sea confortable. El hisopo se puede transportar en hielo en un medio de transporte viral o solución salina estéril. RT-PCR puede realizarse en el fluido embebido en el hisopo para la detección de ARN del SIV y su sub-tipificación posterior.



El muestreo de fluido oral también se ha realizado para SIV. Cuerdas de algodón se colocan dentro de los corrales de los cerdos, donde los cerdos mastican en ellos y dejan su saliva. La saliva se exprime del cordón y puede ser analizada con RT-PCR. Estas muestras no están muy limpias y el ARN puede estar degradado. Sin embargo, se pueden usar para detectar la presencia de SIV a nivel de caseta. Los resultados positivos necesitan ser interpretados con cuidado porque el SIV puede estar presente en nivel bajo en la caseta en la ausencia de signos clínicos.

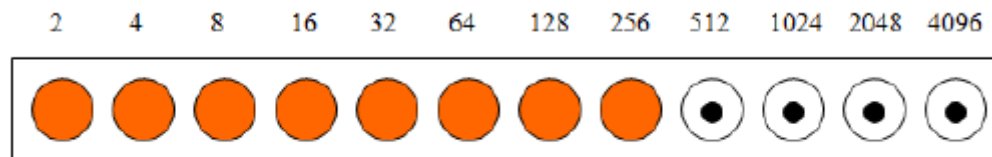
Serología

La regla para obtener títulos agudos y convalecientes todavía aplica para el SIV. Frecuentemente, los títulos agudos verdaderos son difíciles de obtener y las muestras deben ser comparadas a encuestas históricas. Es una buena práctica guardar muestras de sueros por un año para pruebas de sangre de rutina, en el congelador. El autor confirmó la exposición de sus hatos de vientres vacunados contra H1N1 a H3N2 usando el banco de sueros.

Si los cerdos en desarrollo van a ser evaluados, es crítico entender que los cerdos seroconvierten muy pobremente a infecciones vivas de SIV mientras tienen anticuerpos maternos. Dos sangrados por secciones cruzadas en el destete y al final del desarrollo pueden revelar una baja en el promedio de títulos a pesar de la observación de signos clínicos. Marcar y sangrar a los cerdos individualmente no nos da mejores resultados. Los anticuerpos maternos van a bajar a pesar de la infección con SIV. Es mejor mandar los pulmones de cerdos clínicamente enfermos para la evaluación histopatológica y RT PCR.

Prueba HI

La prueba de la inhibición de la hemaglutinina es una prueba serológica con base en la habilidad del SIV de aglutinar (agrupar) glóbulos rojos (RBC, por sus siglas en inglés). Generalmente, glóbulos rojos de pollo o pava se mezclan con una cantidad conocida de virus de influenza muertos, los cuales causan el agrupamiento de los eritrocitos. Si los anticuerpos contra SIV se mezclan al mismo tiempo, estos se unirán al SIV y prevendrán el agrupamiento. Esta prueba se lee a través de diluciones de suero recolectado del animal. Mientras más alta la cantidad de anticuerpos en el suero, más alta la dilución que previene la aglutinación de los eritrocitos. Por consiguiente, esta prueba da una lectura de títulos de A HA en el suero.



El título de HI de este virus en esta fila es 256 (o 2^8).

Si el antígeno del SIV utilizado para la prueba es antigénicamente diferente a los anticuerpos en el suero, va a haber una interacción pobre entre el suero y el virus y por consiguiente no habrá inhibición de la aglutinación, dando como resultado un falso negativo. Es importante actualizar los servicios de la prueba de HI con virus puros, bien caracterizados que circulen comúnmente en el campo. Esto necesita que el virus de campo se aísle, purifique, identifique y propague para usarlo como antígeno de prueba.

Otro problema con la prueba de HI es la variación entre los técnico, fuente RBC y antígenos. Por ejemplo, el título entre el antisuero al virus A y al virus B puede ser diferente que el título entre el antisuero al virus B y al virus A. A veces una reacción cruzada heteróloga puede ser más alta que la reacción cruzada homóloga.

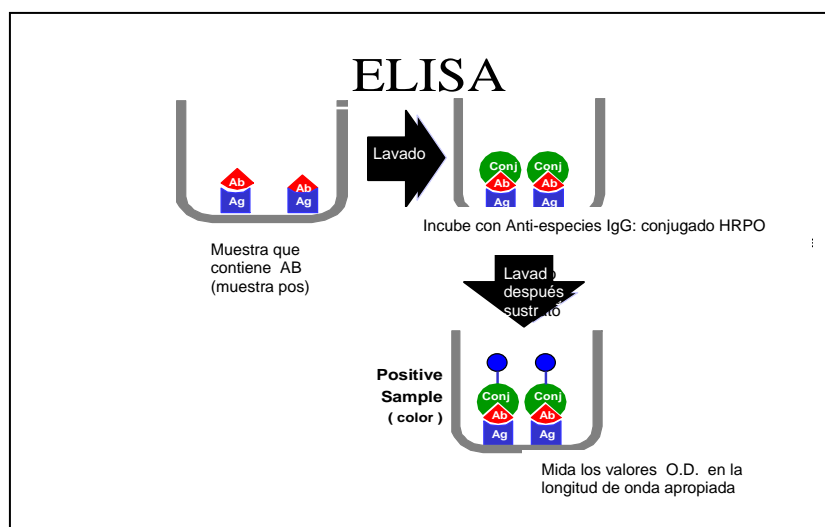
Los anticuerpos vacunales también van a tener una reacción cruzada con el antígeno de la prueba. Esto puede ocurrir en ambos, los anticuerpos producidos activamente así como en los pasivos (maternos), haciendo que sea imposible diferenciar entre la inmunidad de la vacuna y de la infección viva.

Prueba de ELISA

También esta comercialmente disponible una prueba de ELISA para el SIV, provista por los Laboratorios IDEXX. Ya que muchos antígenos para el virus de SI están cubiertos en la placa, hay oportunidad de una reactividad cruzada amplia entre el antígeno de la prueba y el antisuero de campo. Sin embargo, los falsos negativos se han reportado cuando los virus HI de

diferentes grupos (clusters) están co-circulando en la población. Como la prueba de HI, los anticuerpos vacunales no se pueden distinguir de los de la infección viva con la ELISA de SIV de IDEXX.

El Dr. Gramer reportó que la ELISA FlockCheck (verificar la parvada) de IDEXX ha sido validada para su uso en cerdos utilizando unas muestras de sueros conocidas como positivas y negativas. La prueba solo detecta la proteína NP y como tal, no puede sub-tipificar el virus. Es una buena prueba de monitoreo para cepas múltiples de influenza A (incluyendo la aviar y la humana, potencialmente). La prueba no es muy sensible para la exposición vacunal, lo que puede ser una ventaja. El corte para pos/neg recomendado por IDEXX es 0.6 o menos (es una ELISA competitiva). EL Dr. Gramer recomienda que de 0.6 a 0.9 o menos sea considerado sospechoso. La prueba no ha sido aprobada todavía por la USDA CVB para su uso en cerdos, pero está siendo usada por los laboratorios de diagnóstico.



Análisis Genético

Las reacciones PCR de transcriptasa reversa (RT, por sus siglas en inglés) se usan comúnmente para los virus SI. Hay cebadores publicados para todos los genes internos de la mayoría de los subtipos. En el laboratorio de diagnóstico para cerdos, la Prueba RT-PCR está comúnmente dirigida a la HA y genes NA de los subtipos H1, H3, N1 y N2. La RT-PCR puede por consiguiente ser usada para una subtipificación básica. La RT-PCR se puede usar en hisopos nasales, hisopos traqueales, fluidos orales y fluidos de lavados bronqueo-alveolares. La Rt-PCR puede ser automatizada y es más específica que la serotipificación. Las desventajas de la RT-PCR son la necesidad de equipo costoso, técnicos entrenados y la inhabilidad de la RT-PCR para detectar RNA en muestras degradadas.

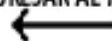
El hallazgo de dos virus del mismo subtipo en una RT-PCR no garantiza que sean el mismo virus. En EUA, los clades separados de virus H1 han co-circulado durante los últimos diez años. Los virus serán identificados como subtipos H1N1 pero pertenecerán a un cluster beta en vez de a un cluster alfa. Estos dos virus también fueron antigénicamente diferentes uno del otro y la protección cruzada por la vacuna fue pobre. Solo la secuenciación genética puede determinar si los dos virus pertenecen al mismo o a diferente clade dentro de un subtipo.

La presencia del ARN viral en la ausencia de signos clínicos o lesiones histológicas no debe ser sobre-interpretado en las granjas en las que el virus es endémico.

Conclusión

Los diagnósticos de SIV pueden ocurrir en un vacío y su interpretación requiere de información que lo soporte de la historia del hato, signos clínicos y resultados de múltiples pruebas. Saber la meta del diagnóstico para la granja es el primer paso en la formulación del plan de diagnóstico. La meta del diagnóstico frecuentemente depende de la historia de la infección y de la vacunación del hato. Entender las dificultades de cada una de las pruebas diagnósticas es también necesario cuando se formula un plan y se interpretan resultados. La tabla aquí abajo resume las diversas pruebas y como se pueden usar en diferentes hatos.

REGRESAR AL MENU





Tipo de hato	Hato Negativo a SIV Sin vacuna	hato Positivo a SIV Sin vacuna		Hato Positivo a SIV Vacuna usada en el hato reproductor solamente		Hato Positivo Vacuna usada en el hato reproductor y en los cerdos en crecimiento
		¿Hay un nuevo subtipo en el hato?	¿Esta afectando a los cerdos en crecimiento el SIV endémico?	¿Hay un nuevo subtipo en el hato?	¿Esta afectando a los cerdos en crecimiento el SIV endémico?	¿Hay una cepa nueva que la vacuna no cubra?
Signos Clínicos	++	++	++	++	++	++
Necropsia con histología y IFA	+++	++	+++	++	+++	+++
RT-PCR y Subtipo en hisopos nasales, hisopos bronquiales, BAL	+++	++	++	++	++	++
RT-PCR y subtipo en fluidos orales	++	+++	+	++	+	+
Prueba HI en suero después del brote usando el virus de campo	++	++	++	++	++	++
Prueba HI en suero después del brote usando un virus similar al de la vacuna	+	+/-	+/-	-	+/-	-
Prueba ELISA para SIV Comercial	+	+/-	+/-	+/-	+/-	-
ELISA Flockcheck de IDEXX	++	-	+	-	+	-

+++ Muy útil si animales agudamente afectados son enviados correctamente

++ Útil si se usa con otra información de apoyo

+ Puede ser útil con otra información de apoyo

+/- Puede ser difícil de interpretar sin otra información de apoyo

- Probablemente ni vale la pena que se haga