

UNIVERSITAT AUTONOMA DE BARCELONA

DEPARTAMENT DE PATOLOGIA I

PRODUCCIONS ANIMALS

**PREVALENCIA DE LAS INFECCIONES POR EL  
VIRUS DE LA GASTROENTERITIS TRANSMISIBLE Y EL  
CORONAVIRUS RESPIRATORIO PORCINO  
EN CATALUNYA**

Trabajo presentado por  
Margarita Martín Castillo para  
optar al grado de Doctor en Veterinaria

Universitat Autònoma de Barcelona  
Servei de Biblioteques



1001400411001

Data	8.5.92
Entrada núm.	44
Sortida núm.	

D. PEDRO CARMENES DIEZ, Catedrático del departamento de Patología Animal (Sanidad Animal) de la Universidad de León y D. JORDI CASAL I FABREGA, Profesor Titular del Departament de Patologia i Produccions Animals de la Universitat Autònoma de Barcelona,

**INFORMAN:**

Que el trabajo titulado "Prevalencia de la infección por el Virus de la Gastroenteritis Transmisible y el Coronavirus Respiratorio Porcino en Catalunya", presentado por Dña. Margarita Martín Castillo para la obtención del grado de Doctor en Veterinaria ha sido realizado en dichos departamentos y bajo su dirección.

Para que conste, firmamos la presente en Bellaterra a 5 de mayo de 1992



Fdo.: Pedro Cármenes Díez

Jordi Casal i Fàbrega



A ALBERT

# AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no se hubiera planteado, ni se habría empezado, ni desarrollado, ni finalizado, si no me hubiese encontrado con tantas personas dispuestas a ayudarme para que la tarea en cada momento fuera más llevadera. Por eso, quiero que estén incluidas junto al texto del trabajo, porque forman parte de él y no quiero olvidarlo nunca.

Quiero agradecer a mis directores de tesis, Pedro Cármenes y Jordi Casal, todo el interés que han demostrado para que adquiriera una formación lo más sólida posible en los campos de la virología y de la epidemiología. De forma muy especial quiero reconocer a Pedro Cármenes la oportunidad que me dio para hacer este trabajo en los laboratorios de la Unidad de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Veterinaria de León.

A Enric Roca, por permitir que recogiera los sueros porcinos en los laboratorios comarcales de la Generalitat de Catalunya, lo que me facilitó sin ninguna duda la selección de las muestras para el estudio epidemiológico. A Inma López, por ayudarme a romper el hielo al inicio de la recogida de muestras.

A todo el personal que trabaja en los laboratorios comarcales de la Generalitat de Catalunya, y especialmente a Charo, Cristina, Martí, Lorenzo y Carmina, por la simpatía con la que me atendieron siempre y por su inestimable colaboración en la recolección de los sueros.

A los componentes de la Unidad de Patología Infecciosa de Barcelona, compañeros durante el trabajo diario, pero amigos a la hora de superar los momentos difíciles. De forma particular, agradezco las horas dedicadas por Mercè componiendo las tablas y por Enric aclarándome dudas acerca del programa Epi-Info.

A Carlos y Albert, al dedicar su tiempo en la confección de algunas de las figuras.

A Jordi Jordana, por colaborar desinteresadamente en la selección de los sueros para el estudio retrospectivo de los lechones.

A mis amigos de León: Nacho, María, Beatriz, Silvia, Rafa, Ana, Gloria, Julia, Chiruca, y todos los demás que no nombro por temor a olvidarme sólo a uno. Los viajes a vuestra ciudad me han permitido conocerlos y contar con vosotros para encontrar siempre la mejor solución a los problemas. De una forma particular aprovecho para agradecer a Nacho toda su dedicación al enseñarme las técnicas de laboratorio, así como el interés por el desarrollo del trabajo en todas las fases.

A Gloria y Julia, dos personas formidables que hicieron posible que las cosas funcionaran durante mi estancia en León.

A Josep Modol, por su buena disposición y eficacia en poner en orden los sueros que traía, facilitándome con ello la identificación correcta de cada muestra.

A Albert, siempre a mi lado para darme ánimos y descargarme de otras obligaciones, como una forma de reconocer mi trabajo.

Y también a todos los seres queridos que han contribuido en mi ánimo para ver el futuro siempre optimista: mis padres, Iris, Rosa, Emilio, Irene, Lucía, Jacinto, Albert, entre otros, sin olvidar a *Gos* ni a *Cirili*.

Por último, quiero agradecer a Pilar su amistad durante los difíciles años que nos tocó pasar juntas, y que al final me cediera el relevo como "guarrinchóloga" de la Unidad, a lo cual aspiro llegar algún día.

A los amigos y compañeros que me habéis animado en todo momento y a todos vosotros que váis a leer esta tesis, sólo me queda deciros ¡¡¡GRACIAS!!!

## INDICE

1. INTRODUCCION	1
2. REVISION BIBLIOGRAFICA	4
2.1. LOS CORONAVIRUS PORCINOS	8
2.1.1. Virus de la gastroenteritis transmisible porcina	8
2.1.1.1. Formas clínicas de la GET	8
2.1.1.2. Patogenia de la GET	9
2.1.1.3. Inmunidad desarrollada tras la infección por el VGET.	10
A) Inmunidad activa	10
B) Inmunidad pasiva	10
2.1.2. Coronavirus respiratorio porcino	11
2.1.2.1. Patogenia del CVRP.	12
2.1.2.2. Inmunidad desarrollada tras la infección por el CVRP.	12
2.1.3. Otros coronavirus porcinos.	13
2.1.3.1. Virus de la diarrea epidémica porcina.	14
2.1.3.2. Virus de la encefalomiелitis hemoaglutinante.	14
2.1.4. Coronavirus relacionados con el VGET.	15
2.2. EPIDEMIOLOGIA DE LAS INFECCIONES POR EL CVRP Y EL VGET	15
2.2.1. Epidemiología de la GET.	15
2.2.2. Epidemiología del CVRP.	16
2.2.2.1. Origen del CVRP.	17
2.2.3. Las infecciones por el VGET y el CVRP en España	18
2.3. DIAGNOSTICO DE LAS INFECCIONES POR EL CVRP Y EL VGET.	19
2.3.1. Diagnóstico clínico de la GET.	19
2.3.2. Diagnóstico laboratorial.	20
2.3.2.1. Diagnóstico anatomopatológico.	20
2.3.2.2. Técnicas para la detección de virus o antígeno vírico.	21
A) Inmunofluorescencia sobre cortes de intestino.	21
B) Aislamiento e identificación.	21
C) ELISA "sandwich" con muestras de heces.	22
D) Microscopía e inmunomicroscopía electrónica.	23
E) Otras técnicas.	24
2.3.2.3. Técnicas serológicas.	25
A) Seroneutralización	26
B) ELISA para la detección de anticuerpos.	26
2.3.2.4.- Técnicas diferenciales.	27
2.4. TRATAMIENTO DE LOS BROTES DE GET.	29
2.5. PROFILAXIS Y CONTROL DE LA GET	30
2.5.1. Ante una piara libre de GET	30

2.5.2. Ante una epizootia de GET	30
2.5.3. Ante una enzootia de GET	31
2.5.4. Tipos de vacunas existentes	31
A) Vacunas a base de virus atenuado.	32
B) Vacunas a base de virus inactivado.	32
C) Vacunas de virus modificado.	32
D) Vacunas de subunidades.	33
3. MATERIAL Y METODOS	34
3.1. POBLACION PORCINA DE CATALUNYA	35
3.1.1. Distribución geográfica del ganado porcino en Catalunya	35
3.2. MUESTRAS DE SUERO	40
3.2.1. Muestras de suero de animales de desvieje	40
3.2.2. Muestras de suero de reproductoras	41
3.2.2.1. Muestreo de las explotaciones	43
3.2.2.2. Cálculo del número de muestras por explotación	43
3.2.3. Muestras de suero de lechones	45
3.3. ANALISIS ESTADISTICO	48
3.4. TECNICAS LABORATORIALES PARA EL DIAGNOSTICO SEROLOGICO	50
3.4.1. Obtención del antígeno para ELISA.	50
3.4.2. ELISA de inmunocaptura	52
3.4.3. ELISA diferencial	57
4. RESULTADOS	63
4.1. RESULTADOS DE LA ENCUESTA PRELIMINAR EN CERDAS DE DESVIEJE	64
4.2. RESULTADOS AL ELISA DE INMUNOCAPTURA EN SUEROS DE REPRODUCTORAS	65
4.2.1. Resultados globales	65
A) Prevalencia de infecciones por el CVRP/VGET.	65
B) Valores de absorbancia de los sueros positivos	66
4.2.2. Resultados según el tamaño de la explotación	68
A) Prevalencia de las infecciones por CVRP/VGET	68
B) Absorbancias de los positivos	69
4.2.3. Resultados según la provincia de origen	74
A) Prevalencia de las infecciones por CVRP/VGET	74
B) Absorbancias de los sueros positivos	75
4.2.4. Resultados según la comarca de origen	78
A) Prevalencia de las infecciones por CVRP/VGET	78
B) Absorbancias de los positivos	82

4.2.5. Resultados según la época del año	83
A) Prevalencia de las infecciones por el CVRP/VGET	83
B) Absorbancias de los positivos	86
4.3. RESULTADOS AL ELISA DE INMUNOCAPTURA EN EXPLOTACIONES DE REPRODUCTORAS	88
4.3.1. Prevalencia de infección por el CVRP/VGET	88
4.3.2. Resultados según el tamaño de las granjas	89
4.3.3. Resultados según el origen de las explotaciones	91
4.3.4. Resultados según la época del año	91
4.4. RESULTADOS POR ELISA DIFERENCIAL	92
4.4.1. Resultados al ELISA diferencial en sueros de reproductoras	92
4.4.2. Resultados al ELISA diferencial en explotaciones	93
4.4.2.1. Prevalencia de las granjas según el tamaño de la explotación	95
4.4.2.2. Asociación entre el tamaño de la granja y la infección por el CVRP o el VGET.	95
4.4.2.3. Cálculo de la prevalencia dentro de las granjas.	96
4.4.2.4. Prevalencia del VGET según el tamaño de la explotación.	98
4.4.3. Determinación del porcentaje de competición de los sueros positivos al VGET.	98
4.4.3.1. Época del año	100
4.4.3.2. Presencia de anticuerpos en la granja	101
4.5. RESULTADOS DEL ESTUDIO RETROSPECTIVO DE LAS INFECCIONES POR EL CVRP Y EL VGET.	102
5. DISCUSION	105
5.1. DISCUSION DE LA METODOLOGIA EMPLEADA	106
5.2. DISCUSION DE LOS RESULTADOS GLOBALES	108
5.3. DISCUSION DE LOS RESULTADOS EN EL ESTUDIO RETROSPECTIVO	108
5.4. DISCUSION DE LOS RESULTADOS AL CVRP	110
5.4.1. Tamaño de la explotación	111
5.4.2. Origen de los sueros	112
5.4.3. Época del año	113
5.5. DISCUSION DE LOS RESULTADOS AL ELISA DIFERENCIAL	114
5.5.1. Prevalencia de las granjas	114
5.5.2. Prevalencia dentro de las granjas	115
5.5.3. Porcentaje de competición	116
6. CONCLUSIONES	117
7. RESUMEN	119
8. BIBLIOGRAFIA	121

**"¡Pero tú qué te crees que es  
hacer una tesis de gochos...!"**

Frase popular de León, 1990-91.

# 1. INTRODUCCION

Las infecciones víricas en el ganado porcino suelen tener graves consecuencias económicas en las explotaciones afectadas. La gastroenteritis transmisible porcina (GET) puede cursar con alta mortalidad de lechones durante los primeros días de vida, que pueden suponer una pérdida difícil de remontar. Al hacerse enzoótica, la GET da lugar a pérdidas menos visibles, no tan drásticas, pero que hacen replantear la rentabilidad de la explotación.

En cambio, en granjas que no tienen problemas clínicos aparentes, pueden detectarse algunos virus, a los que no se les concede demasiada atención, debido a su escasa importancia clínica y económica.

La aparición de un nuevo coronavirus porcino de tropismo respiratorio, pero sin patología aparente asociada (CVRP), y que induce anticuerpos neutralizantes indistinguibles de los del VGET, llamó la atención de muchos investigadores europeos por su interferencia con el diagnóstico de la GET. En España se ha demostrado la presencia de ambos virus en diversas ocasiones, pero a pesar de todo, no existen suficientes estudios acerca de su epidemiología en nuestro país, ni tampoco de la situación de estas infecciones en algunas de las áreas más importantes en la producción porcina, como es el caso de Catalunya. La importancia del sector ganadero porcino en Catalunya queda bien reflejada por su elevado censo de animales de cebo y reproductores y la alta calidad sanitaria de las explotaciones existentes.

Ante esta situación nos planteamos la necesidad de iniciar una serie de estudios epidemiológicos en Catalunya que nos ayudara a despejar las incógnitas acerca de algunas enfermedades de los animales domésticos, entre ellas las infecciones por el VGET y el CVRP.

## **1.1. OBJETIVOS**

Determinar la prevalencia de positivos al virus de la gastroenteritis transmisible y coronavirus respiratorio porcino en muestras de suero de animales reproductores, utilizando para ello un ELISA de inmunocaptura.

Para diferenciar entre los sueros positivos con anticuerpos específicos frente al VGET o sólo al CVRP, se utilizaría un ELISA de bloqueo con anticuerpos monoclonales.

Otro objetivo fue determinar la fecha aproximada de la introducción del CVRP en las explotaciones porcinas de Catalunya, realizando una serología retrospectiva con sueros de lechones de cebo.

El estudio epidemiológico de los resultados según el origen de los animales por comarcas y provincias, tamaño de las explotaciones, y fecha de la recogida del suero, podría contribuir a un mayor conocimiento de las infecciones, que permitiesen adoptar mejores medidas de control.

## **1.2. PLAN DE TRABAJO**

En primer lugar, realizar un muestreo de la población porcina de Catalunya que nos permitiera recoger los sueros de una forma representativa de la población, y extrapolar los resultados.

También llevar a cabo una selección de sueros de lechones para el estudio retrospectivo de las infecciones por el CVRP y el VGET en Catalunya, desde 1985.

Obtener el antígeno para las pruebas serológicas, utilizando una cepa de VGET poco virulenta y cultivos ST porcinos.

Estudiar todos los sueros recogidos por ELISA, técnica de inmunocaptura, para la determinación de positivos a CVRP/VGET

Determinar qué sueros son positivos al VGET y cuáles sólo al CVRP, mediante el ELISA diferencial, utilizando un monoclonal como solución de bloqueo.

Estudio epidemiológico de los resultados, de acuerdo con las variables que hemos anotado durante la recogida de las muestras.

## 2. REVISION BIBLIOGRAFICA

La familia CORONAVIRIDAE está formada por diversos virus capaces de producir alteraciones respiratorias o digestivas tanto en los animales como en el hombre. Se han aislado de un amplio rango de mamíferos y aves, pero es destacable la especificidad de cada uno de ellos para infectar a un hospedador y un tejido determinados (66). Los estudios realizados en diferentes países demuestran que estas infecciones son de difusión mundial.

Los coronavirus se pueden clasificar en cuatro grupos antigénicos, todos ellos pertenecientes al género *Coronavirus*. En la tabla I se relacionan los de mayor interés indicando cuál es su hospedador específico. El virus de la diarrea epidémica porcina se ha incluido dentro de la familia por su morfología y propiedades físico-químicas, aunque no está asignado a ningún grupo antigénico por el momento (123). Actualmente, los coronavirus se identifican por sus características biológicas y moleculares, lo que permite establecer con más precisión las relaciones antigénicas y de homología del ácido nucleico entre las diferentes especies (138).

El genoma de los coronavirus está constituido por una cadena sencilla de ARN, de polaridad positiva y de  $5 \times 10^6$  a  $7 \times 10^6$  dalton de peso molecular, con alta capacidad de recombinación entre especies.

Estructuralmente son pleomórficos, de un tamaño entre 60 y 200 nm de diámetro. La presencia en la envoltura de unas proyecciones hacia el exterior en forma de maza (peplómeros), grandes y bien separadas, con apariencia de corona es lo que da nombre a la familia (figura 1). Estos peplómeros tienen un tamaño aproximado de 24 nm y no siempre resulta sencillo observarlos ya que se pierden con facilidad durante la manipulación en el laboratorio.

En todos los coronavirus están presentes tres proteínas estructurales que representan los tres antígenos principales (66, 138):

- La proteína N fosforilada, que forma la nucleocápside junto con el ARN genómico.

- La glicoproteína M, localizada en el interior de la doble membrana lipídica de la envoltura del virus.

- La glicoproteína S, que constituye el peplómero y localizada también en la envoltura. Esta proteína es responsable del ensamblaje del virus a los receptores celulares y determina el tropismo tisular que tiene cada coronavirus, así como la aparición de anticuerpos neutralizantes durante la infección.

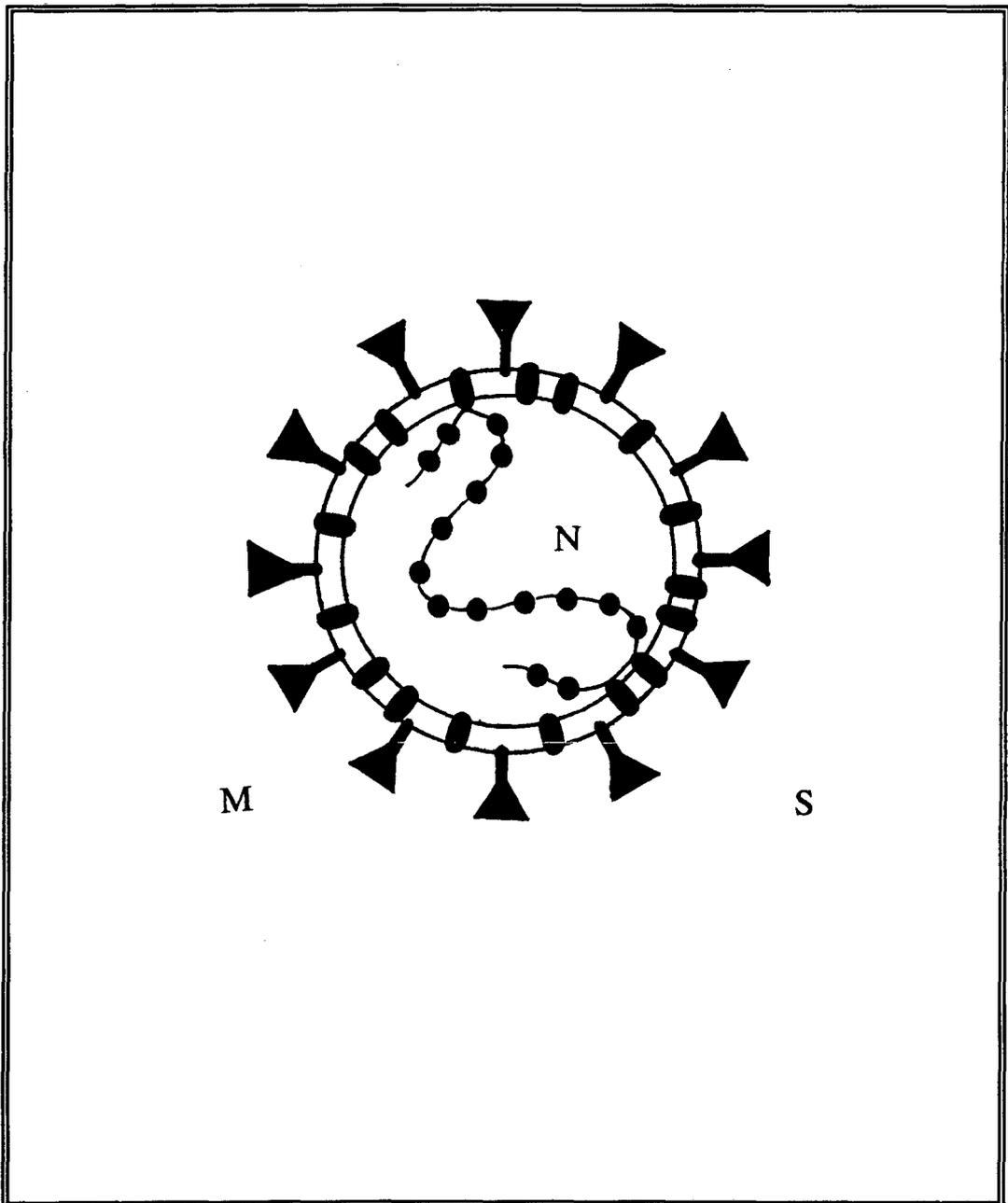


Figura 1. Representación esquemática de un coronavirus

<b>GRUPO ANTIGENICO</b>	<b>VIRUS/ENFERMEDAD</b>	<b>HOSPEDADOR</b>
<b>MAMIFEROS GRUPO 1</b>	<b>Gastroenteritis transmisible</b>	<b>Cerdo</b>
	<b>Coronavirus respiratorio porcino</b>	<b>Cerdo</b>
	<b>Peritonitis infecciosa felina</b>	<b>Gato</b>
	<b>Coronavirus canino</b>	<b>Perro</b>
	<b>Coronavirus humano 229E</b>	<b>Hombre</b>
<b>MAMIFEROS GRUPO 2</b>	<b>Encefalomielitis hemaglutinante</b>	<b>Cerdo</b>
	<b>Coronavirus canino</b>	<b>Vaca</b>
	<b>Hepatitis del ratón</b>	<b>Ratón</b>
	<b>Coronavirus humano OC43</b>	<b>Hombre</b>
<b>AVES GRUPO 1</b>	<b>Bronquitis infecciosa aviar</b>	<b>Gallina</b>
<b>AVES GRUPO 2</b>	<b>Cresta azul del pavo</b>	<b>Pavo</b>
<b>SIN CLASIFICAR</b>	<b>Diarrea epidémica porcina</b>	<b>Cerdo</b>

**Tabla I: Clasificación de los principales coronavirus**

## 2.1. LOS CORONAVIRUS PORCINOS

El cerdo (*Sus scrofa*) es receptivo a la infección natural por varias especies del género *Coronavirus*, y puede padecer enfermedades con cuadros clínicos de diversas características y gravedad. Estos agentes son:

- Virus de la gastroenteritis transmisible porcina (VGET)
- Virus de la diarrea epidémica porcina (VDEP)
- Virus de la encefalomiелitis hemoaglutinante o enfermedad del vómito y desmedro de los lechones (VEH).
- Coronavirus respiratorio porcino (CVRP).

De todos ellos, el que ocasiona las pérdidas económicas de mayor consideración es el VGET que causa infecciones que suelen cursar con cuadros graves de diarrea y vómitos. Aunque son sensibles los cerdos de todas las edades, destaca la altísima mortalidad, cercana al 100%, que produce en los lechones de menos de una semana de vida, porcentaje que va disminuyendo con la edad, siendo baja en cerdos de más de cinco semanas de vida. Al no existir en la práctica un tratamiento específico ni disponer de vacunas eficaces, la GET está considerada como una de las enfermedades más graves de los lechones recién nacidos (17).

La reciente aparición de un coronavirus porcino de tropismo respiratorio (CVRP), antigénicamente relacionado con el VGET, y su rápida difusión por las explotaciones porcinas de varios países europeos, ha producido interferencias en el diagnóstico de la GET.

### 2.1.1. VIRUS DE LA GASTROENTERITIS TRANSMISIBLE PORCINA

La primera descripción de la gastroenteritis transmisible porcina (GET) la realizaron Doyle y Hutchings en 1946 en Estados Unidos (43) y desde entonces se ha detectado en gran número de países.

#### 2.1.1.1. Formas clínicas de la GET

La **forma epizoótica**, es la que se manifiesta por primera vez en una explotación indemne y que afecta a gran número de animales, caracterizada por la aparición súbita de vómitos continuados y diarreas acuosas. Estos síntomas dan lugar a deshidratación, pérdida de peso rápida y muerte en pocas horas de prácticamente el 100% de los

lechones menores de 1 semana de vida. Las madres también pueden verse afectadas, pero con menor gravedad, aunque la reacción febril puede ser causa de una disminución de la secreción láctea que generalmente contribuye a agravar el cuadro en los lechones de su camada (133).

En teoría, cuando en una población porcina no inmune se presenta por primera vez la infección por VGET, el cuadro clínico suele ser lo suficientemente característico para permitir su identificación, pudiendo llegar a emitir un diagnóstico de la enfermedad atendiendo solamente a los datos epidemiológicos, clínicos y lesionales. No obstante se debe diferenciar de otros cuadros similares en los lechones, como el producido por el VDEP, los rotavirus y *E. coli* enterotoxigénico.

La existencia de animales portadores asintomáticos, junto con la introducción continuada de animales receptivos, contribuyen a que el VGET permanezca en una granja y que la enfermedad evolucione hacia la **forma enzoótica** (133, 120). Esto es frecuente en granjas de ciclo cerrado con un programa de partos continuado, y que regularmente aportan lechones para la reposición y el cebo, los cuales se hacen sensibles a la infección tras el destete. De forma similar sucede en las granjas de cebo de ciclo continuo infectadas enzoóticamente, a las que pueden llegar periódicamente animales de otras explotaciones indemnes a la infección y totalmente desprovistos de inmunidad frente al VGET (17).

En estos casos se modifica la presentación clásica de esta infección y se observan preferentemente diarreas tras el destete, ya que al cesar la ingestión de leche hay una disminución rápida de la inmunidad pasiva adquirida a partir de la leche de las madres inmunes. En la época de partos es posible ver lechones lactantes con vómitos y diarreas graves, generalmente nacidos de madres primíparas o de reposición no inmunes. En el engorde, los cuadros de diarrea son más leves, con una mortalidad baja, y se hace necesario recurrir al laboratorio para descartar otras causas de diarrea que afectan a los cerdos jóvenes, como son la colibacilosis, la diarrea epidémica, la disentería y las infecciones por rotavirus.

#### 2.1.1.2. Patogenia de la GET

Los lechones se infectan por vía oral y el VGET se multiplica en las células epiteliales del yeyuno e íleon produciendo una atrofia de las vellosidades intestinales. La replicación vírica en el epitelio es de mayor intensidad en el caso de cepas virulentas que de cepas atenuadas o modificadas (155). El virus excretado por las heces es una fuente de infección para la madre y otros animales de la camada (80).

En los animales adultos, sin embargo, la vía de entrada más probable y el punto

inicial de multiplicación es el tracto respiratorio superior (80, 147). Las cerdas infectadas con el VGET no manifiestan síntomas y pueden eliminar el virus al ambiente, especialmente en los meses de invierno mediante toses y estornudos (79). Posteriormente, el virus puede llegar al aparato digestivo por ingestión de secreciones de origen respiratorio, y al tejido mamario por vía hematogena (81). La excreción a través de la leche infectada explicaría la rápida difusión de la infección a toda la camada de lechones (80).

### 2.1.1.3. Inmunidad desarrollada tras la infección por el VGET.

#### **A) Inmunidad activa**

El contacto del hospedador con el virus estimula la producción de inmunidad humoral y local. Los anticuerpos circulantes son detectables como mínimo durante 6 meses y son útiles para la detección serológica de animales que han estado en contacto con el virus, aunque no confieren protección ni dan información precisa acerca de la inmunidad activa local (57, 58). Los animales que se recuperan de la GET están protegidos frente a una reinfección gracias a la inmunidad local de la mucosa intestinal, durante un periodo de tiempo variable, que puede depender de la edad del animal y de la gravedad de la exposición (133). Tras la multiplicación en el epitelio del intestino delgado, las células linfoides de la *lamina propria* secretan IgA que dan protección local. Probablemente, parte de estas IgA pasan a la circulación por lo que la detección de este isotipo de inmunoglobulinas en el suero podría servir como indicador de la inmunidad activa desarrollada por cada individuo (83).

Además de las IgA se ha demostrado a nivel local una inmunidad mediada por células (25, 26, 50) que podría explicar la recuperación de los animales tras una infección intestinal por el VGET y la protección frente a posteriores reinfecciones.

#### **B) Inmunidad pasiva**

Las madres que se infectan a lo largo del último mes de gestación desarrollan inmunidad, principalmente asociada a IgG e IgA, que transmiten de forma pasiva a sus lechones, a través del calostro y de la leche. Las inmunoglobulinas ingeridas con la leche son capaces de neutralizar al VGET presente en la luz intestinal y a esta protección local de los lechones durante el periodo de lactación se la conoce como inmunidad lactogénica (57).

Las inmunoglobulinas contenidas en el calostro son principalmente IgG procedentes del suero de la madre (133). En cambio, la presencia de IgA en la leche se

explica por una conexión "intestinal-mamaria", en la que los inmunocitos intestinales maternos estimulados por la infección vírica migran hacia la glándula mamaria para secretar localmente IgA (132). La presencia en la leche del isotipo IgA es la que confiere la protección más eficaz, ya que la concentración de IgG disminuye con rapidez después de la primera semana de lactación y se destruye en su mayor parte por la acción de los jugos gástricos, mientras que la de IgA se mantiene elevada, y no se ve afectada a su paso por el tracto digestivo (133).

La protección pasiva proporcionada por la cerda a los lechones varía según la dosis vírica que ha infectado a la madre y la fase de gestación en el momento de la infección, así como el volumen de leche ingerido por el lechón y la frecuencia de tomas diarias (19).

Aynaud *et al.* (8) postulan que las cerdas infectadas inducen una inmunidad lactogénica que dura toda la vida económica del animal (2-3 años). La renovación paulatina de estas cerdas lleva consigo la desaparición de inmunidad en esa granja y la descripción de nuevos brotes de GET.

#### 2.1.2. CORONAVIRUS RESPIRATORIO PORCINO

La existencia de este virus se puso de manifiesto a partir de 1984 en Bélgica, tras detectarse un aumento desproporcionado del número de animales con anticuerpos neutralizantes anti-VGET en cerdos que no mostraban síntomas de vómitos y diarreas en ninguno de los grupos de edad (121). Las investigaciones que siguieron a esta observación permitieron el aislamiento de un virus, indiferenciable del VGET en cuanto a morfología y propiedades neutralizantes, pero con marcadas diferencias de interacción con el hospedador, al tener modificado su tropismo hacia el aparato respiratorio (34, 35, 120, 122, 127).

Rasschaert *et al.* (129) demostraron algunas diferencias básicas en la secuencia de nucleótidos del extremo 3' del genoma del CVRP al compararlo con cepas del VGET:

- Supresión de 672 nucleótidos en el genoma del CVRP con respecto al VGET, por lo que no se codifica una proteína no estructural, de función desconocida en el VGET. Se cree que esta proteína podría estar relacionada con el tropismo del virus hacia las células intestinales, ya que esta afinidad está ausente o muy disminuida en el CVRP.

- Presencia de determinantes antigénicos existentes en el CVRP y ausentes en el VGET. Esta diferencia permitiría diferenciar la infección específica del coronavirus respiratorio concomitante o no con la GET.

Por otra parte, la modificación de la glicoproteína S en el CVRP, en los sitios antigénicos que inducen la formación de anticuerpos no neutralizantes, ha podido ser demostrada por diferentes investigadores (15, 53, 77, 105) mediante anticuerpos monoclonales.

El desarrollo de técnicas laboratoriales que consigan la detección específica de cada virus así como de los anticuerpos circulantes que inducen, permitirá identificar sin interferencias las infecciones por el VGET y por el CVRP en los individuos.

#### 2.1.2.1. Patogenia del CVRP.

En la infección natural, el CVRP se multiplica preferentemente en el epitelio del tracto respiratorio. Se detecta en células epiteliales de la mucosa nasal, de la tráquea y de los pulmones. Con menor intensidad el CVRP también se puede multiplicar en el íleon y extenderse cranealmente al resto del intestino delgado (34, 122, 126). La aparición del CVRP en el tracto digestivo puede deberse a la ingestión de virus procedente de la intensa multiplicación en el aparato respiratorio o a la llegada de virus con la sangre (122).

Su capacidad patógena no está totalmente definida, ya que algunos autores creen que no produce síntomas aunque sí lesiones neumónicas (34, 88, 110), otros le atribuyen alteraciones ligeras similares a la infección por virus influenza (46, 73, 75, 148), e incluso se ha descrito la presentación de neumonía grave mortal tras la infección experimental de lechones SPF (108).

#### 2.1.2.2. Inmunidad desarrollada tras la infección por el CVRP.

El mecanismo por el que se produce inmunidad frente al CVRP no se conoce, pero probablemente sea similar al de la GET, existiendo en este caso una conexión entre la mucosa respiratoria y la glándula mamaria (42).

Los animales infectados por el CVRP inducen la producción de anticuerpos neutralizantes indistinguibles de los inducidos por el VGET y son detectables en suero y leche (23). Los distintos estudios de inmunidad cruzada con el VGET no han demostrado claramente que confiera protección a los lechones frente a la infección intestinal.

Bernard *et al.* (13) encontraron que las madres infectadas previamente con el CVRP conferían un grado de protección a los lechones cuando se infectaban con una cepa de VGET virulento, comparable a la inmunidad proporcionada por una cepa modificada

vacunal (cepa 188-SG). Un argumento que exponen a favor de la protección cruzada es la observación de un descenso en el número de casos clínicos de GET desde la aparición del CVRP.

En cambio, Paton y Brown (112) creen que la alta prevalencia de infección por el CVRP y la baja incidencia de GET encontradas en Europa no implica una protección cruzada entre ambas infecciones, ya que en otras ocasiones la incidencia de la GET ha fluctuado sin tener relación con la presencia del CVRP. Estos mismos autores no hallaron ninguna evidencia de protección para los lechones después de la infección con CVRP a cerdas seronegativas durante la gestación.

Según Hooybergs *et al.* (68), las cerdas con anticuerpos anti-CVRP no están protegidas frente al VGET y sus lechones pueden sufrir la GET con las mismas características que los nacidos de cerdas sin anticuerpos anti-CVRP. En cambio pudieron demostrar que la respuesta inmunológica frente al VGET aparece con mayor rapidez e intensidad en los animales que poseen anticuerpos anti-CVRP, lo que sería equivalente a una respuesta anamnésica (68, 120).

Niewstadt *et al.* (109), opinan que una infección por el CVRP puede estimular la inmunidad de las mucosas de forma que la respuesta lactogénica a la infección por el VGET sea más rápida. La disminución de la gravedad de los brotes de GET puede tener esta explicación.

### 2.1.3. OTROS CORONAVIRUS PORCINOS.

Entre los coronavirus específicos del cerdo se encuentran el virus de la diarrea epidémica porcina (VDEP) y el virus de la encefalitis hemoaglutinante (VEH).

Morfológicamente no existen diferencias apreciables ni entre ellos ni con el VGET, pero la identificación precisa de cada uno puede establecerse utilizando las técnicas de inmunofluorescencia e inmunomicroscopía electrónica (IME) (116, 124), entre otras, ya que no se observan reacciones cruzadas.

Sin embargo, Yaling *et al.* (158) han demostrado que existe relación antigénica entre los diferentes antígenos N de coronavirus de diferentes grupos, empleando técnicas de mayor sensibilidad, como la inmunotransferencia ("immunoblotting") y la inmunoprecipitación.

Para detectar la existencia de infección por alguno de los coronavirus porcinos es preferible utilizar el diagnóstico serológico, ya que los anticuerpos inducidos son

diferenciables entre sí por seroneutralización o ELISA.

#### 2.1.3.1. Virus de la diarrea epidémica porcina

La infección por el VDEP se puede manifestar de dos formas, dependiendo de la edad de los animales afectados. La diarrea epidémica tipo I (DEP I) se presenta en cerdos de cebo, sin que se vean afectados los lechones menores de 4-5 semanas. En cambio, en la diarrea epidémica tipo II (DEP II) los brotes aparecen en animales de todas las edades, incluyendo los lechones lactantes. En este caso, la enfermedad es muy parecida a la GET, excepto en que la transmisión entre los animales de la granja es más lenta y la mortalidad en los lechones lactantes es menor (117).

La patogenia es similar para los dos tipos de DEP, ya que el virus se multiplica en el citoplasma de las células epiteliales del intestino delgado y del colon en animales de todas las edades (38). No se conocen los factores que influyen en la presentación de la DEP tipo I o II.

#### 2.1.3.2. Virus de la encefalomiелitis hemoaglutinante

El VEH es el agente etiológico de la enfermedad del vómito y desmedro de los lechones (3). Da lugar a dos formas clínicas en los animales menores de 3 semanas: un cuadro de vómitos continuados y emaciación, y una forma nerviosa con signos clínicos de encefalomiелitis. La enfermedad es de rara aparición a pesar de su amplia distribución geográfica, ya que los lechones suelen estar protegidos por anticuerpos calostrales y al destete desarrollan una inmunidad activa como consecuencia de infecciones subclínicas (119).

Este coronavirus se multiplica en el aparato respiratorio, de donde se suele aislar sin existir ninguna sintomatología asociada. La intensa multiplicación del virus permite el paso al sistema nervioso central a través de terminaciones nerviosas, pero sin viremia (3). La sintomatología es en todos los casos una consecuencia de la alteración de diferentes núcleos nerviosos (2).

El VEH tiene en común con el CVRP el tropismo por las células epiteliales del aparato respiratorio, pero no se conoce ninguna otra característica compartida entre ambos virus.

#### 2.1.4. CORONAVIRUS RELACIONADOS CON EL VGET.

Otros coronavirus que tienen afinidad para multiplicarse *in vivo* en células intestinales porcinas, son el VPIF y el CVC. Tras la infección experimental de lechones lactantes se han observado lesiones intestinales similares a las producidas por el VGET, aunque sin sintomatología asociada.

Woods *et al.* (155) comprobaron la multiplicación del CVC en las células epiteliales de las criptas del íleon en lechones infectados experimentalmente.

Tras la infección con el VPIF, estos mismos autores observaron lesiones en el epitelio del yeyuno e íleon del lechón, de extensión similar a las producidas por el VGET virulento, pero de menor gravedad.

No hay descripciones de la infección natural del cerdo por estos coronavirus.

## 2.2. EPIDEMIOLOGIA DE LAS INFECCIONES POR EL CVRP Y EL VGET

En los últimos años, el incremento en la actividad del mercado ganadero entre los distintos países de la Comunidad Europea (C.E.) ha facilitado la amplia difusión de agentes patógenos entre la población porcina de Europa por medio de animales portadores. En la actualidad las infecciones por coronavirus se consideran ampliamente extendidas en los países de Europa occidental.

### 2.2.1. EPIDEMIOLOGÍA DE LA GET.

La forma epizootica de la GET suele presentarse en los meses de invierno, posiblemente porque el virus es muy estable a bajas temperaturas y está bien resguardado de la luz solar (56).

El VGET se introduce en las explotaciones a partir de cerdos portadores, diseminándose rápidamente por toda la explotación a partir de las heces de los cerdos con diarrea, de forma que en el espacio de dos o tres días el 100% de los animales pueden estar infectados (133). En algunos casos, la aparición de la GET no está relacionada con la entrada de nuevos animales, sino con la transmisión mecánica del virus mediante fómites (botas, vehículos, utensilios) contaminados en otras explotaciones.

Después de producirse un brote de GET, pueden volver a repetirse estacionalmente nuevos brotes sin que exista reintroducción del virus ya que los propios

animales de la granja que están infectados subclínicamente sirven de reservorios del VGET (140). En estos casos el virus persiste en las unidades afectadas aunque la diseminación entre los animales es más lenta (60).

Otras especies animales podrían servir de reservorios del virus para una explotación o actuar de vectores de la infección entre diferentes granjas. Entre ellos, el estornino puede transmitir mecánicamente el VGET mediante sus extremidades e incluso por sus excrementos, ya que el virus es ingerido y pasa por el intestino sin multiplicarse (17).

Algunos carnívoros con acceso a las granjas porcinas podrían actuar también de reservorios. Experimentalmente, Larson *et al.* (92) demostraron que el VGET es capaz de multiplicarse en el intestino del perro y de eliminarse por las heces con poder infectante para los lechones. Sin embargo, esta excreción se observó durante un periodo no superior a dos semanas, sin ninguna manifestación clínica en los perros. En la infección experimental del gato por la vía oral, no se han detectado manifestaciones clínicas, pero el virus se elimina con las heces entre 3 y 22 días después de la infección (17). La infección natural de estos y tal vez otros carnívoros, y su estado de portador asintomático podría tener alguna influencia en la epidemiología de la GET.

Las canales de cerdos infectados por el VGET pueden ser una fuente de infección para cerdos sensibles. La mezcla con el alimento de un macerado a base de ganglios linfáticos y músculo recogidos de cerdos aparentemente sanos, procedentes de un área con GET enzoótica (31), o bien de ganglios linfáticos, músculo y médula ósea obtenidos de canales de cerdos infectados expuestos al VGET (49), reprodujo la enfermedad en lechones sensibles. En países o áreas libres de la infección, la importación de canales de cerdo refrigeradas procedentes de zonas con GET enzoótica representa un riesgo potencial que debería tenerse en cuenta al tomar medidas de policía sanitaria (31).

### 2.2.2. EPIDEMIOLOGÍA DEL CVRP.

La difusión del CVRP es muy rápida, tanto dentro de una explotación, cuando se introduce por medio de algún portador, como entre explotaciones más o menos cercanas. Esta alta difusibilidad se debe a su transmisión por vía aerógena, facilitada por los sistemas de ventilación forzada existentes en las grandes explotaciones y por las corrientes de aire naturales. También ha contribuido a su extensión el transporte de animales portadores entre países de la C.E.

Varios años después de su aparición, la infección por el CVRP puede considerarse extendida por Europa, de tal forma que en algunos países prácticamente el

100% de las granjas han sido infectadas por el CVRP, entre los cuales se encuentran los países exportadores de ganado porcino más importantes, como Bélgica, Holanda y Dinamarca (120). En Estados Unidos se ha detectado una variante respiratoria del VGET antigénicamente similar a las cepas europeas de CVRP (153).

La alta prevalencia del CVRP podría haber provocado una modificación en la presentación de la GET (ver 2.1.2.2.). Los animales infectados por el CVRP presentan en el suero altas tasas de anticuerpos neutralizantes indiferenciables de los inducidos tras la infección por el virus de la GET, y aunque no estén protegidos frente a la enfermedad, sí se ha demostrado una respuesta específica más rápida, los animales se recuperan más fácilmente y el número de lechones muertos por camada parece ser menor (68). A favor de esta hipótesis está la disminución de casos clínicos de GET en Europa tras la descripción del CVRP (13).

#### 2.2.2.1. ORIGEN DEL CVRP.

La aparición de un nuevo agente vírico es siempre difícil de explicar y mucho más de demostrar. Se han enunciado diferentes hipótesis acerca del origen del CVRP (74):

1- Una serie de mutaciones puntuales del VGET habrían producido cambios en la parte del genoma encargada de codificar la glicoproteína S. Las diferencias en la proteína del peplómero, que es la encargada del ensamblaje del coronavirus a las células diana, podrían explicar el cambio de tropismo del CVRP hacia el aparato respiratorio (129).

2- La recombinación genética entre el VGET y otro coronavirus capaz de aportar una modificación en el genoma y alterar la glicoproteína S, en concreto en los sitios antigénicos B y C (135). Esta recombinación podría haber tenido lugar entre el VGET y otro coronavirus capaz de multiplicarse en el intestino del lechón. El VDEP, el CVC o el VPIF, cumplen este requisito y comparten teóricamente un mismo nicho ecológico que favorecería la recombinación (38, 155). Estructuralmente, la secuencia nucleotídica del CVRP es más parecida al VPIF que al VGET (70), por lo que no se descarta la posible recombinación entre el coronavirus felino y el VGET en el origen del CVRP.

3- La adaptación de un coronavirus heteroespecífico muy relacionado al VGET para multiplicarse en tejidos del cerdo (74). Aunque se ha comprobado la multiplicación de coronavirus de origen canino y felino en el intestino del cerdo, no se ha demostrado que estos virus tengan afinidad por otras células porcinas distintas de las intestinales.

4- Un posible cambio de tropismo de cepas vacunales de VGET administradas por nebulización y utilizadas en algunos países europeos (120). Esta hipótesis contrasta con la estabilidad antigénica comprobada en cepas de VGET de distinto origen y tras varios pases *in vivo* e *in vitro* (65, 78, 93, 135). Otro argumento en contra de esta hipótesis es que las características de los aislados de CVRP no coinciden con los de las cepas vacunales empleadas, las cuales siguen conservando su tropismo intestinal (74).

Estas hipótesis no son únicas ni tienen porque ser excluyentes unas de otras, ya que pueden haber sido varias las causas que dieran origen al nuevo coronavirus o incluso podría tratarse de una sucesión de acontecimientos que hayan concluido con la aparición del CVRP (74).

### 2.2.3. LAS INFECCIONES POR EL VGET Y EL CVRP EN ESPAÑA

La elevada y sostenida prevalencia de GET en explotaciones de países próximos con los que se mantienen relaciones comerciales, hace sospechar que la entrada a España del VGET y otros agentes infecciosos ha tenido lugar a través de portadores asintomáticos, ya sean lechones con destino a cebaderos o reproductores.

La primera descripción clínica en España de una enfermedad considerada como GET la realizó Concellón en 1960 (30). Existe alguna otra referencia clínica de brotes locales (29), aunque sin demostrar la presencia ni del virus ni de anticuerpos específicos.

A principios de los años 80 Plana *et al.* (125) describieron clínicamente la enfermedad en el levante español y lo confirmaron con el primer aislamiento del VGET efectuado en España, aunque esta cepa no ha sido conservada y no se han podido realizar otros estudios.

Recientemente, Laviada *et al.* (95) identificaron al virus (cepa M-88) por segunda vez a partir de un brote de diarrea. Una semana antes de iniciarse el cuadro diarreico, se habían recibido en la granja tres lechones procedentes de Bélgica que desde su llegada manifestaron diarrea. La aparición de otros animales con los mismos síntomas en el resto de la granja hizo sospechar que aquellos lechones fueron el origen de la infección.

Jiménez (76) pudo detectar el VGET por radioinmunoensayo (RIA) y contraradioinmunoensayo (CRIA) en muestras sospechosas procedentes de Segovia y Murcia, pero no consiguió aislar ningún virus.

No existen muchos estudios epidemiológicos que aclaren cuál es la verdadera situación de la GET en España. Sólo en los últimos años se ha despertado el interés por

los coronavirus porcinos y se han llevado a cabo análisis serológicos encaminados a determinar la prevalencia en la población.

La primera encuesta serológica fue realizada por Rubio *et al.* (131) con sueros recogidos en Castilla y León en 1984-1985, no encontrando ningún animal seropositivo al VGET. Posteriormente, en esta misma zona, Lanza *et al.* (91) detectaron la presencia de anticuerpos en sueros recogidos durante 1988, pero mediante una técnica diferencial se consideraron positivos sólo al CVRP.

En la región de Murcia, Cubero *et al.* (37) realizaron una amplia encuesta durante 1987 en la que detectaron animales seropositivos al CVRP/VGET. Utilizando una técnica diferencial se demostró la presencia de anticuerpos específicos del VGET aunque con una baja prevalencia en las explotaciones.

En la zona Centro la prevalencia de anticuerpos neutralizantes al VGET detectada en 1989 fue elevada (159). Ante la ausencia de cuadros de diarrea, los autores consideraron que esta respuesta era debida a la infección por el CVRP.

## **2.3. DIAGNOSTICO DE LAS INFECCIONES POR EL CVRP Y EL VGET.**

### **2.3.1. DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LA GET.**

La gastroenteritis transmisible es una enfermedad con un cuadro clínico lo suficientemente característico que permite sospechar de su existencia en los lechones. La aparición de GET por primera vez en una granja se reconoce porque están afectadas varias cerdas y la mayoría de los lechones lactantes. Las elevadas tasas de morbilidad y mortalidad permiten diferenciarla de otras diarreas de etiología infecciosa.

En casos de GET enzoótica el cuadro clínico es distinto, con diarrea después del destete y una disminución neta de la ganancia de peso en los cerdos de cebo. En los adultos y de engorde la GET enzoótica queda muchas veces sin diagnosticar, ya que los leves signos que manifiestan (inapetencia y diarrea de corta duración) pueden pasar desapercibidos y resulta difícil llegar al diagnóstico clínico (17).

Numerosas enfermedades cursan en el cerdo con cuadros clínicos similares a los de la GET, entre las más importantes están la DEP, las infecciones por rotavirus y por *E. coli* enteropatógeno.

### 2.3.2. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

La importancia económica y el carácter contagioso de la GET exigen que el diagnóstico sea rápido, pero también específico para que las medidas de control aplicadas sean eficaces (128).

Un punto crítico del diagnóstico es la recogida y envío de las muestras. Ante un brote de diarrea la muestra de elección es un asa intestinal de yeyuno e íleon, que se extrae de un lechón afectado de la enfermedad y se remite al laboratorio en el plazo más breve posible. Si se trata de detectar portadores, algunos autores (79, 114, 147) consideran muy útiles los raspados de tonsilas de animales adultos para intentar el aislamiento del VGET.

Los análisis serológicos están indicados para el diagnóstico de rebaño, ya sea para determinar la prevalencia de la infección por el VGET en una población (133), o para demostrar la presencia de animales portadores en las formas enzoóticas (120). La detección de anticuerpos circulantes sólo indica un contacto anterior con el virus, pero no informa si la infección es o no reciente.

#### 2.3.2.1. Diagnóstico anatomopatológico.

Los lechones lactantes que mueren en un brote de GET están deshidratados y manchados con heces. En la necropsia las lesiones están localizadas en el tracto digestivo. El estómago y el intestino pueden estar, o bien distendidos por el acúmulo de gas, o bien vacíos, o en ocasiones con restos de un contenido amarillento y coágulos de leche sin digerir (17).

El intestino delgado tiene un aspecto translúcido con las paredes muy adelgazadas, lo que histológicamente se corresponde con una destrucción del epitelio intestinal del yeyuno e íleon y la consiguiente atrofia de las vellosidades.

Estas lesiones son indiferenciables de las que se producen tras la infección con otros coronavirus porcinos.

### 2.3.2.2. Técnicas para la detección de virus o antígeno vírico.

#### **A) Inmunofluorescencia sobre cortes de intestino.**

La inmunofluorescencia directa (IFD) es una de las técnicas más utilizadas para llegar al diagnóstico ya que combina una alta especificidad con una gran rapidez en la obtención del resultado (111). El método se basa en aplicar un antisuero anti-VGET marcado con fluoresceína sobre cortes de intestino.

Las infecciones por el VGET y el VDEP producen síntomas y lesiones similares, pero se pueden diferenciar en la mayoría de los casos mediante antisueros específicos aplicados a cortes de intestino (124).

Otros coronavirus relacionados antigénicamente al VGET dan reacciones por IFD indiferenciables en cuanto a extensión e intensidad (155). Ignatov *et al.* (69), obtuvieron mejores resultados en la IFD utilizando un conjugado anti-VPIF preparado a partir de fluido peritoneal de un gato infectado con VPIF, en comparación con el conjugado preparado a partir de lechones SPF infectados con el VGET, lo que confirma, por otra parte, la estrecha relación entre ambos virus.

Con el mismo fundamento que la IFD se ha utilizado el método de la peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) (28, 71), con la misma sensibilidad y especificidad. Tiene el inconveniente de presentar reacciones inespecíficas con la peroxidasa endógena de los eosinófilos de la *lamina propria* intestinal, y la interpretación en algunos casos puede ser confusa. Como ventajas sobre la IF, los autores destacan que la lectura puede hacerse con un microscopio óptico normal y no se necesita personal entrenado en la interpretación de la IF (28).

#### **B) Aislamiento e identificación.**

- Infección experimental de lechones desprovistos de inmunidad.

La inoculación por vía oral de material sospechoso en un lechón receptivo a la infección por VGET es una prueba muy sensible para obtener un diagnóstico de campo, ya que reproduce el cuadro de vómitos y diarreas característico (17, 45). A pesar de todo, se deberían descartar otras etiologías como causa de la diarrea haciendo un diagnóstico diferencial similar al que se lleva a cabo ante una infección natural. En la práctica, el principal inconveniente de este método es su elevado coste comparado con otras técnicas de diagnóstico.

- Aislamiento del VGET en cultivos celulares de origen porcino.

El aislamiento del VGET en cultivos celulares se realiza a partir de muestras de heces o macerados de intestino. La multiplicación del VGET se consigue en cultivos primarios de riñón de cerdo, en cultivos primarios o secundarios de tiroides porcino y en cultivos de testículo de cerdo.

También pueden utilizarse líneas continuas para hacer el aislamiento primario, la más utilizada es la línea ST (79, 157), obtenida a partir de testículo porcino (100). El efecto citopático (ECP) observado a los 3-7 días de la infección con el VGET consiste en el redondeamiento y desprendimiento de las células del tapiz, que puede favorecerse si se añade tripsina al medio de cultivo (67, 85), o usando cultivos viejos que acidifiquen ligeramente el medio (133).

Al intentar el aislamiento primario, puede ser necesario realizar varios pases ciegos antes de observar el ECP que demuestre la multiplicación del VGET *in vitro*.

La confirmación del aislamiento del VGET en el cultivo se realiza por neutralización de la multiplicación del virus, por IF o por IME, mediante el empleo de un antisuero específico anti-VGET (133). Un método rápido de diagnóstico se consigue al aplicar la IF sobre cultivos celulares infectados, ya que permite detectar la presencia del virus a las 24 horas, cuando aún no se observa el ECP (102).

Ya que el CVRP y el VGET pueden multiplicarse en el mismo tipo de células y también pueden aislarse de la misma muestra, es necesario usar anticuerpos monoclonales específicos frente al VGET para diferenciarlos (111). No hay posibilidad de confusión con el CVC o con el VPIF ya que estos virus no han conseguido multiplicarse en cultivos celulares de origen porcino (157).

### **C) ELISA "sandwich" con muestras de heces.**

Son varios los métodos de ELISA diseñados para la detección del VGET en muestras sospechosas, pero en la mayoría de los casos se utiliza el ELISA "sandwich", o ELISA puente de anticuerpos.

La puesta a punto de un ELISA para detectar antígeno en muestras de heces la llevaron a cabo por primera vez Bernard *et al.* (14), utilizando para el tapizado de las placas una mezcla de anticuerpos monoclonales dirigidos a las tres principales proteínas antigénicas del VGET: S, M y N. Como conjugado se empleó un antisuero policlonal porcino anti-VGET. La técnica resultó ser muy sensible y específica, con un límite de detección de proteína vírica de 15 ng/ml. Los autores comprobaron además que con este

método se detectan mejor las cepas de virus de campo que las atenuadas como la cepa Purdue-115.

Van Nieuwstadt *et al.* (107) utilizaron IgG de conejo anti-VGET para tapizar la placa y capturar el antígeno de la muestra. Antes de poner el conjugado añadieron una mezcla de anticuerpos monoclonales dirigidos a diferentes epitopos del virus y por último el conjugado anti-IgG de ratón. Este procedimiento permitió incrementar la especificidad de la prueba disminuyendo los falsos positivos causados por factores presentes en algunos sueros porcinos. El límite de detección en esta prueba fue de 31 ng/ml, siendo similar al anterior en cuanto a sensibilidad.

Lanza (87) describe un ELISA "doble sandwich" en el que se aumenta la especificidad de la prueba al impedir la reacción anómala de factores reumatoídes y otros, existentes en el suero de cerdo. Para ello, la muestra se diluye con suero porcino antes de añadirla a la placa tapizada con IgG porcinas anti-VGET. El límite de detección calculado con este ELISA fue de  $3 \times 10^5$ , sensibilidad que fue superior a la conseguida de  $7 \times 10^5$  al utilizar anticuerpos monoclonales para la captura del antígeno.

Ninguno de estos autores encontraron reacciones cruzadas con otros enteropatógenos porcinos, entre ellos rotavirus o virus de la diarrea epidémica.

Laviada *et al.* (95) realizaron un ELISA indirecto, que encontraron más sensible que el ELISA "sandwich" para la detección de antígeno vírico en heces. Emplearon un conjugado de IgG anti-VGET marcado con biotina aplicado directamente sobre las muestras fijadas en la placa. No citaron límite de detección de antígeno ni especificidad de esta prueba.

#### **D) Microscopía e inmunomicroscopía electrónica.**

El microscopio electrónico se ha utilizado para el estudio de lesiones producidas por el VGET (92, 152) y también para identificar al VGET en muestras de heces. Su sensibilidad es bastante baja respecto a la IFD y su especificidad disminuye cuando se pierden los peplómeros característicos en la manipulación de las muestras. Aunque pueda llegar a demostrarse la peculiar estructura en corona del VGET, no sirve para emitir un diagnóstico ya que morfológicamente no se diferencia con el VDEP ni con otros coronavirus potencialmente patógenos del cerdo.

La IME se basa en la observación de acúmulos de origen vírico formados en presencia de anticuerpos específicos (134), detectando no sólo virus sino también proteínas, lo que aumenta la sensibilidad respecto a la microscopía electrónica convencional (ME). El empleo de antisueros específicos permite diferenciar el tipo de

virus y descartar la presencia del VDEP, igual que en la IFD.

Van Nieuwstadt *et al.* (106) describieron una variante en fase sólida para la IME del VGET, mejorando hasta 100 veces más la detección de virus en las heces comparado con la ME. Los autores citan como ventaja frente a la IF que puede utilizarse para diagnosticar la infección en animales vivos y no es necesario realizar cortes de intestino.

#### **E) Otras técnicas.**

La búsqueda de nuevos sistemas para la detección del VGET en muestras sospechosas ha facilitado la puesta a punto de otras técnicas que, aunque son útiles, no han conseguido desplazar a las anteriores para el diagnóstico rutinario.

La **hemoaglutinación pasiva inversa** (4), se ha demostrado útil, pero con dos inconvenientes de importancia: necesita antígeno purificado, y además la técnica resulta muy laboriosa porque requiere la sensibilización previa de hematíes ovinos frente al VGET.

La **inmunodifusión en gel de agarosa** puede utilizarse tanto para detectar antígeno en muestras, como anticuerpos séricos usando un antígeno sin purificar. A pesar de ser una técnica sencilla (16), sus resultados como prueba serológica guardan poca concordancia con los de la seroneutralización (99).

Los avances en la tecnología del DNA recombinante han permitido el desarrollo de **sondas de cDNA para detectar RNA vírico** en muestras sospechosas.

Shockley *et al.* (137) usaron clones con determinados fragmentos del genoma del VGET y del coronavirus bovino (dos virus que no están relacionados antigénicamente), con la finalidad de detectar RNA vírico en muestras fecales mediante "dot blot". Las sondas preparadas a partir de estos clones se marcaron con fósforo radiactivo y detectaron hasta 25 pg de RNA del virus homólogo, resultando negativa la hibridación con el coronavirus no emparentado. Al comparar esta técnica con la ME, se comprobó que ésta permite detectar la eliminación de virus más precozmente, aunque la detección con sondas fue tan rápida como el aislamiento empleando cultivos celulares. Estas sondas pueden ser útiles para detectar la presencia de coronavirus pertenecientes al mismo grupo antigénico, pero no son específicas de un solo virus.

Benfield *et al.* (11), utilizaron la técnica de "dot blot" para detectar al VGET en

muestras fecales y en cultivos celulares. De las sondas utilizadas, la derivada del clon pD24 fue capaz de diferenciar el VGET de otros coronavirus relacionados, aunque Bae *et al.* (9) citan que existe hibridación débil de esta sonda con el coronavirus canino. Los ensayos de especificidad de las diferentes sondas demostraron la hibridación con RNAt de levadura, pero no con el coronavirus bovino, ni con el rotavirus porcino, ni con el VEH (11). Con respecto a la sensibilidad, estos autores concluyen que la ME o la IF son métodos más sensibles para detectar cerdos infectados que la hibridación con las sondas utilizadas.

Los **anticuerpos monoclonales** en el diagnóstico laboratorial se utilizan para demostrar la presencia de los determinantes antigénicos del VGET para los que son específicos. Con este fundamento se ha utilizado el ELISA sobre cultivos celulares y sobre frotis de mucosa (141), y también se ha desarrollado una técnica de enzimoimmunoadsorción ("immunodot") para muestras de intestino y de heces (1), útil para el diagnóstico de campo. El principal inconveniente en todos los casos es que se requieren muestras frescas y, por tanto, no pueden almacenarse.

#### 2.3.2.3. Técnicas serológicas.

En casos de **epizootia**, Bohl (17) recomienda que el suero se recoja preferentemente de animales convalecientes, o bien tomar una muestra de suero en el periodo agudo de la enfermedad y otra en la fase de convalecencia, para observar el incremento de la tasa de anticuerpos.

En cambio para la **GET enzoótica**, el mismo autor considera que es mejor recoger muestras de cerdos en cebo (entre 2 y 6 meses de edad) ya que los anticuerpos maternos han desaparecido y la presencia de inmunidad humoral indicará una infección reciente por el VGET.

En los estudios epidemiológicos la mayoría de investigadores suelen emplear sueros de cerdas reproductoras ya que su vida productiva es más larga, permanecen más tiempo en la explotación y han tenido más posibilidades de entrar en contacto con los diversos agentes patógenos. Sin embargo, los resultados de estos análisis deben saber interpretarse ya que los anticuerpos circulantes persisten varios años tras la infección natural (8) y un resultado seropositivo al VGET puede indicar tanto una infección reciente como una anterior ya superada (17, 149).

### **A) Seroneutralización**

La seroneutralización (SN) en cultivos celulares es la prueba de referencia para el diagnóstico serológico de la GET (111). Con ella se obtienen resultados altamente específicos, no se necesita un gran volumen de suero y permite procesar muchas muestras si se utiliza la técnica en microplaca (84, 146, 150).

A pesar de estas ventajas no carece de inconvenientes, especialmente a partir de la aparición del CVRP, ya que no es capaz de diferenciar los anticuerpos de ambas infecciones. Además, este método exige tener un laboratorio dotado de material específico y de personal entrenado para realizar los cultivos celulares, lo que encarece la puesta en marcha y el mantenimiento de esta prueba de diagnóstico.

### **B) ELISA para la detección de anticuerpos.**

El ELISA para la detección de anticuerpos anti-VGET fue utilizado por primera vez por Balsari *et al.* (10). Estos autores observaron que existía una buena correlación entre las absorbancias obtenidas con el ELISA "sandwich" o inmunocaptura y el título por SN. La sensibilidad y especificidad de esta prueba fueron más elevadas que al utilizar un ELISA indirecto, empleando en ambos casos un antígeno no purificado.

El ELISA indirecto fue mejorado en sensibilidad y especificidad por Nelson y Kelling (104) empleando un antígeno purificado obtenido mediante gradiente de densidad. La respuesta inmunitaria se pudo detectar más precozmente con el ELISA que con SN y los títulos de anticuerpos obtenidos fueron diez veces superiores.

Bernard *et al.* (15) desarrollaron un ELISA de inmunocaptura empleando para el tapizado de las placas una mezcla de tres anticuerpos monoclonales específicos de las tres proteínas estructurales del VGET. La técnica dio una sensibilidad inferior a lo esperado respecto a la SN, pero como ventaja los autores señalan el poder utilizar un antígeno no purificado, muy fácil de conseguir a partir del sobrenadante de cultivos celulares infectados.

Hohdatsu *et al.* (64) pusieron a punto otro ELISA indirecto, preparando un antígeno purificado y posteriormente solubilizado con detergente para favorecer la exposición de los antígenos. Los resultados de estos autores tuvieron una buena correlación con la SN.

Cubero *et al.* (36) compararon varias técnicas de ELISA escogiendo el método

indirecto con antígeno a base de virus concentrado para la realización de un estudio epidemiológico.

Lanza *et al.* (90) compararon el ELISA indirecto y el de inmunocaptura, ambos con virus concentrado como antígeno, obteniendo los mejores resultados con el ELISA "sandwich", con un 91% de sensibilidad y un 99% de especificidad comparado con la SN. Los títulos obtenidos con la prueba ELISA fueron entre 5 y 20 veces superiores a los conseguidos con la SN.

Recientemente, Paton *et al.* (113) pusieron a punto un ELISA de competición con el propósito de sustituir a la SN en el diagnóstico de rutina por su mayor rapidez y bajo coste. En el desarrollo de la técnica utilizaron como solución de bloqueo el anticuerpo monoclonal 6AC3 (72) dirigido a un epitopo común al CVRP y al VGET. El antígeno para tapizar las placas se preparó mediante un tratamiento con detergente, los sueros problema se incubaron durante una noche y el resto del test se llevó a cabo en sólo una hora. La sensibilidad y especificidad de este ELISA fueron muy similares a los de la SN, aunque con los sueros positivos no hubo correlación significativa entre los valores de absorbancia y el título seroneutralizante.

#### 2.3.2.4.- Técnicas diferenciales.

La aparición a mediados de los años ochenta de un coronavirus porcino (CVRP), estrechamente emparentado con el VGET y de rápida difusión entre las explotaciones, sirvió de estímulo para la investigación y de una metodología capaz de diferenciar entre los dos virus o los anticuerpos específicos de una o ambas infecciones.

La obtención de anticuerpos monoclonales dirigidos a diferentes epitopos del VGET han permitido elaborar el mapa antigénico de este virus y de otros coronavirus relacionados y detectar las diferencias fundamentales entre ellos (32, 33, 51, 93). La competición entre los anticuerpos específicos anti-VGET y los anticuerpos monoclonales por unirse al sitio antigénico hacia el que están dirigidos ha sido el fundamento de las técnicas diferenciales.

Laude *et al.* (94) utilizaron la inmunofluorescencia indirecta (IFI) para determinar la capacidad de reacción de cada anticuerpo monoclonal con cada una de las proteínas estructurales víricas y poder elaborar el mapa antigénico. De los anticuerpos monoclonales que obtuvieron, los de mayor interés en la puesta a punto de un ELISA de competición fueron los que estaban dirigidos al sitio D de la proteína S del peplómero, ya que en el mapa antigénico este sitio apareció conservado en las cepas del VGET y ausente en las del CVRP estudiadas.

Garwes *et al.* (53) describieron la producción de anticuerpos monoclonales anti-VGET y su reacción específica con determinadas cepas del VGET y del CVRP, pero sin citar a qué sitios antigénicos estaban dirigidos. El ELISA realizado sobre cultivos celulares infectados empleando estos anticuerpos monoclonales dió buenos resultados para la diferenciación entre ambos virus. Antes de que la técnica pueda ser utilizada de forma rutinaria, los autores proponen hacer más ensayos para determinar si es capaz de detectar infecciones recientes, así como comprobar la especificidad de los anticuerpos monoclonales con mayor número de cepas de VGET y CVRP.

Callebaut *et al.* (22) estudiaron por inmunotransferencia la reacción de algunos anticuerpos monoclonales con diferentes coronavirus porcinos: VGET, CVRP, VDEP y VEH. Mediante anticuerpos monoclonales anti-VGET estudiaron el grado de relación antigénica entre el CVRP y el VGET, comprobando que los epitopos que inducen anticuerpos neutralizantes son indistinguibles entre ambos virus. Los sitios B, C y D de la proteína S indujeron anticuerpos no neutralizantes que no reconocieron al CVRP, lo que indica que estos epitopos están modificados o ausentes en las cepas estudiadas.

Estas diferencias en la estructura antigénica fueron aprovechadas por los mismos autores para desarrollar un ELISA de competición (24) empleando el anticuerpo monoclonal 1DB12 (72), el cual reconoce diferentes cepas de campo de VGET y ninguna de las cepas de CVRP aisladas por el momento. Los resultados obtenidos indican que la prueba tiene una alta sensibilidad ya que pudo detectar anticuerpos específicos a las 2-3 semanas post-infección con un título similar al de SN. También fue posible detectar anticuerpos anti-VGET en presencia de anticuerpos anti-CVRP, aunque se registraron falsos negativos con sueros que dieron además títulos bajos por SN. Los autores concluyen que el uso de una mezcla de anticuerpos monoclonales dirigidos a diferentes epitopos específicos del VGET podría reducir el número de estos falsos negativos.

Con el mismo anticuerpo monoclonal, 1DB12, Brown y Paton (21) y Lanza (87), pusieron a punto otras técnicas inmunoenzimáticas diferenciales. La especificidad de la reacción del 1DB12 fue comprobada previamente por Sánchez *et al.* (135) siendo capaz de reconocer diversas cepas del VGET aisladas en Europa, América y Japón, mientras que no se observó ninguna reacción con las cepas de CVRP aisladas de diferentes países europeos.

Van Nieuwstadt *et al.* (105) demostraron que este anticuerpo monoclonal no era capaz de reconocer la cepa Erica de VGET. De los obtenidos por estos autores sólo uno, el 57\*110 dirigido también a la proteína S del peplómero, pudo detectar todas las cepas de VGET estudiadas, aunque con la cepa Erica los títulos fueron más bajos y desaparecieron más rápidamente tras la infección que con otras cepas de VGET.

Por último, Bernard *et al.* (13) en un estudio experimental para determinar la protección frente al VGET tras la infección por el CVRP, describen un ELISA diferencial con dos anticuerpos neutralizantes, uno de ellos discriminante (44-4, específico del VGET) (39), y el otro no (E4, dirigido a un epitopo común del sitio A de la proteína S). Con esta prueba se logró determinar si un suero era positivo al CVRP y negativo al VGET (competición sólo con el E4), positivo al VGET (competición con el 44-4 y el E4), o negativo a la infección por ambos virus (no compite con ninguno de los dos anticuerpos monoclonales).

#### **2.4. TRATAMIENTO DE LOS BROTES DE GET.**

No se han obtenido agentes antivíricos que sirvan para el tratamiento específico de la gastroenteritis transmisible (133). La actividad antivírica del interferón- $\alpha$  porcino se ha mostrado sólo moderada frente al VGET (41), mientras que la de origen bovino no consiguió proteger de la infección experimental a lechones de 48 horas (96).

El único tratamiento disponible en la práctica es el sintomático, dirigido, por una parte, a reducir la mortalidad en lechones de 3-4 días y por otra, a impedir las complicaciones secundarias con otros agentes infecciosos en los animales destetados.

Pritchard (127) recomienda tomar las siguientes medidas como una pauta para el tratamiento de un brote de GET en lechones:

- 1) Procurar que los animales lactantes afectados estén en un ambiente cálido y seco.
- 2) Dejar agua a libre disposición de los lechones con diarrea aguda, o en su lugar una solución de electrolitos o nutrientes para corregir la deshidratación, la acidez metabólica y la inanición (44).
- 3) Una terapia antimicrobiana es útil en cerdos de 2-5 semanas, ya que permite controlar las infecciones concurrentes de *E. coli*.

En ocasiones, la incorporación de clortetraciclina en el alimento ha dado como resultado una mejora de la condición física en cerdos afectados de más de 11 días de edad (151).

En casos de GET aguda, otra medida aconsejada por varios autores (127, 143) es suministrar leche de cerdas inmunes a GET a aquellos lechones sensibles o que ya manifiesten diarrea.

## **2.5. PROFILAXIS Y CONTROL DE LA GET**

### **2.5.1. ANTE UNA PIARA LIBRE DE GET**

En áreas libres de GET, pero con riesgo de introducir animales portadores procedentes de otras zonas infectadas, las medidas de profilaxis aconsejables son únicamente de tipo sanitario. Entre otras, Aynaud *et al.* (6) recomiendan controlar las entradas y salidas de personas, animales y vehículos en toda la explotación, la desinfección periódica de utensilios, locales y vehículos, y serología negativa al VGET en los animales destinados a la reposición. Actualmente, las reacciones cruzadas con anticuerpos anti-CVRP hacen necesario el empleo además de una prueba diferencial.

### **2.5.2. ANTE UNA EPIZOOTIA DE GET**

Si se ha producido por primera vez la entrada del virus en la explotación, las medidas a tener en cuenta se orientan a impedir que se convierta en una infección enzoótica. En este caso la mayoría de los autores (63, 145, 154) son partidarios de poner la granja en cuarentena, sin permitir la entrada o salida de animales e impedir la diseminación de la infección fuera de la granja por medio de la limpieza y desinfección de vehículos, ropa y utensilios que puedan introducirse en otras explotaciones, así como la destrucción de los cadáveres. Posteriormente, se debería asegurar la exposición vírica de todos los animales, pero especialmente de las cerdas destinadas a la reproducción, para favorecer el desarrollo de inmunidad protectora. Esta medida no es aconsejable para las cerdas gestantes a las que les falte menos de 2 semanas para el parto, las cuales deben mantenerse aisladas del resto.

Como pautas complementarias también es recomendable desinfectar la paridera después de cada parto y antes de introducir otra cerda, así como esperar tres o cuatro meses antes de introducir nuevos animales receptivos que al infectarse perpetuarían la infección en la granja. Templeton y Carpenter (145) aconsejan adquirir al principio del brote, animales de diferentes edades que sirvan para la reposición durante el periodo de cuarentena. Cuando ya no se detecten más casos de GET en lechones se pueden introducir animales centinelas y controlarlos serológicamente para poder considerar que la granja está libre del VGET.

### 2.5.3. ANTE UNA ENZOOTIA DE GET

Cuando la GET se ha convertido en un problema enzoótico, Paul *et al.* (115) consideran que la mejor medida que puede adoptarse es interrumpir el ciclo infeccioso del VGET impidiendo el aporte periódico de nuevos animales receptivos a la sala de engorde, lo que se consigue al anular el ciclo continuo de partos y practicar el "todo dentro-todo fuera".

Esta forma de actuar también debe acompañarse de la inmunización activa de todos los animales, incluso verracos y cerdas primíparas, para que desarrollen o reactiven la protección específica (115, 145). Para ello, se suele dar con el pienso un macerado de intestino obtenido de un lechón con diarrea o mezclarlo directamente con las heces de animales con síntomas. A pesar de conseguir unos buenos niveles de protección esta práctica no deja de tener unos riesgos (47) que deben valorarse antes de ponerla en marcha. Por un lado, la dosis infectante que se suministra a cada animal es desconocida, puede introducirse involuntariamente otro patógeno no detectado hasta el momento, existe el riesgo de desarrollar o mantener una GET enzoótica y además la infección puede extenderse a otras granjas vecinas.

Se han ensayado diversos tipos de vacunas con las cuales se pretende conseguir el mismo efecto que tras la exposición al virus virulento (47, 59), pero sin los riesgos mencionados.

### 2.5.4. TIPOS DE VACUNAS EXISTENTES

Las propiedades que debería cumplir la vacuna ideal frente a la GET son revisadas por Paul *et al.* (115) destacando las siguientes características:

- Que sea capaz de proteger frente a todas las cepas de VGET.
- Su poder inmunógeno debería ser elevado para todos los animales vacunados, y producir un aumento de IgA en la leche de las cerdas en lactación.
- La vía de administración no debería alterar sus propiedades

Los factores que influyen en el grado de protección de los lechones dependen en parte de que la vacuna tenga estas propiedades, pero también depende de factores relacionados con el animal, como la cantidad de IgA secretada por la leche de la madre, así como el volumen y frecuencia de ingestión del lechón (6, 61).

### **A) Vacunas a base de virus atenuado.**

Pueden administrarse por vía oral y/o intramuscular y en algunos casos por vía intramamaria. Las vacunas que se dan por vía oral a lechones son capaces de inducir protección activa, sin interferir con la inmunidad pasiva adquirida con la leche ( 48). En cambio las vacunas aplicadas por vía intramuscular en las madres sólo confieren una inmunidad esencialmente por IgG y de baja concentración (18). La vía intramamaria se ha utilizado para probar una vacuna a base de virus vivo modificado (cepa Nouzilly), aunque los resultados indican que la respuesta inmune es a base de IgG en altas concentraciones (7).

La falta de una respuesta adecuada por parte de este tipo de vacunas se atribuyen a su baja capacidad de multiplicación *in vivo* (6) lo que se traduce en una menor estimulación del tejido linfoide intestinal (132), y a su fragilidad en el aparato digestivo inactivándose gran parte de la dosis vacunal.

El ensayo de una vacuna heteróloga, a base de CVC, en cerdas gestantes produjo una respuesta de anticuerpos neutralizantes frente al CVC y al VGET detectables en suero, calostro y leche, que protegió escasamente a los lechones tras la infección experimental con el VGET (156). Los porcentajes de morbilidad y mortalidad fueron similares a los observados en el grupo inmunizado con una vacuna homóloga.

### **B) Vacunas a base de virus inactivado.**

En las madres se han utilizado por vía intramuscular y en los lechones por vía intraperitoneal. Ya que es necesaria la replicación del virus en el intestino para estimular la inmunidad, estas vacunas no son satisfactorias ni resultan útiles para vacunar cerdas en explotaciones infectadas (8).

Tanto en las vacunas atenuadas como en las inactivadas la eficacia demostrada es variable, pero la inmunidad inducida nunca es de la misma calidad que la estimulada por el virus virulento (103).

### **C) Vacunas de virus modificado.**

Se ha conseguido obtener variantes del VGET virulento mediante su manipulación en el laboratorio (534 T-2 35 ). Los ensayos clínicos de este tipo de vacunas demuestran que son capaces de disminuir los índices de morbilidad y mortalidad en los animales vacunados, aunque se deben seguir algunas condiciones, relacionadas con la vía de

administración y con la pauta o dosificación de la vacunación, es decir, sólo la vía oral ha demostrado ser eficaz para inmunizar a las cerdas gestantes, siendo necesaria la revacunación antes del parto (5).

#### **D) Vacunas de subunidades.**

La identificación de las fracciones más inmunógenas del VGET es el punto de partida para obtener vacunas de subunidades eficaces (115). Se ha comprobado que en la glicoproteína S del peplómero se localizan los principales sitios antigénicos del virus (40), y los epitopos responsables de inducir los anticuerpos neutralizantes tras la infección (54). Una fracción proteica de 23 kd obtenida a partir de la proteína S del VGET, fue capaz de inducir inmunidad lactogénica tras la inoculación intramamaria, consiguiendo disminuir los porcentajes de morbilidad y mortalidad en los lechones lactantes (55)

Las vacunas de subunidades están actualmente en fase de estudio y podrían ser las utilizadas en un futuro próximo, aunque todavía hace falta disponer de la tecnología capaz de producirlas a gran escala para que resulten económicas y encontrar el vector más apropiado para su expresión en el cerdo, entre lo cuales se han propuesto el virus vaccinia, el baculovirus y las levaduras (52, 115).

### **3. MATERIAL Y METODOS**

### 3.1. POBLACION PORCINA DE CATALUNYA

El censo de ganado porcino en Catalunya asciende a cerca de 4,8 millones de animales, según las estadísticas ganaderas realizadas en 1988 por la **Secció Territorial de Programes i Estadística del Departament d'Agricultura Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya (D.A.R.P.)**. Esta cifra se ha mantenido sin grandes oscilaciones durante los últimos años, lo que indica la gran estabilidad de este sector ganadero. La población porcina de Catalunya supone un 28% del censo total en España (16,9 millones de animales), y un 2,5% del total en los países de la C.E. (190,4 millones) (101).

Del total de animales censados, alrededor de 500.000 son cerdas reproductoras y más de 4 millones se reparten entre lechones con un peso inferior a 20 kg y cerdos de engorde (tabla II). Estos datos se han obtenido a partir de las estadísticas ganaderas realizadas por el D.A.R.P. en 1988.

CERDOS DE ENGORDE	4.221.457
REPRODUCTORES	537.007
TOTAL ANIMALES	4.758.464

Tabla II: Censo porcino en Cataluña.

#### 3.1.1. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DEL GANADO PORCINO EN CATALUNYA

La distribución del ganado porcino en las cuatro provincias catalanas no es uniforme, ya que Lleida y Barcelona poseen entre ambas más de tres millones de cabezas, como puede observarse en la tabla III.

	ENGORDE	REPRODUCTORES	TOTAL
GIRONA	706.934	83.062	789.996
LLEIDA	2.148.423	207.352	2.355.775
TARRAGONA	440.841	63.688	504.529
BARCELONA	925.259	183.085	1.108.344

Tabla III: Distribución del censo porcino por provincias.

Pero dentro de cada provincia también existen diferencias notables en la distribución, concentrándose el mayor número de animales en las siguientes comarcas: Noguera, Segrià, Urgell y Pla d'Urgell en la provincia de Lleida; Bages y Osona en Barcelona; y Alt Empordà en Girona (figura 2). La distribución de reproductoras es casi idéntica en proporción, excepto para las comarcas de Urgell y Pla d'Urgell que concentran un gran número de cerdos de cebo procedentes de otras zonas (figura 3).

El censo de explotaciones destinadas a la reproducción sigue un patrón parecido al de individuos. Sin embargo, existen diferencias en algunas comarcas atribuibles al distinto tamaño de las granjas, como por ejemplo en la comarca del Montsià (Tarragona), con un censo total de porcino de más de 100 mil animales y sólo 62 explotaciones de reproducción. En la tabla V y en la figura 4 se puede observar la distribución comarcal de las explotaciones.

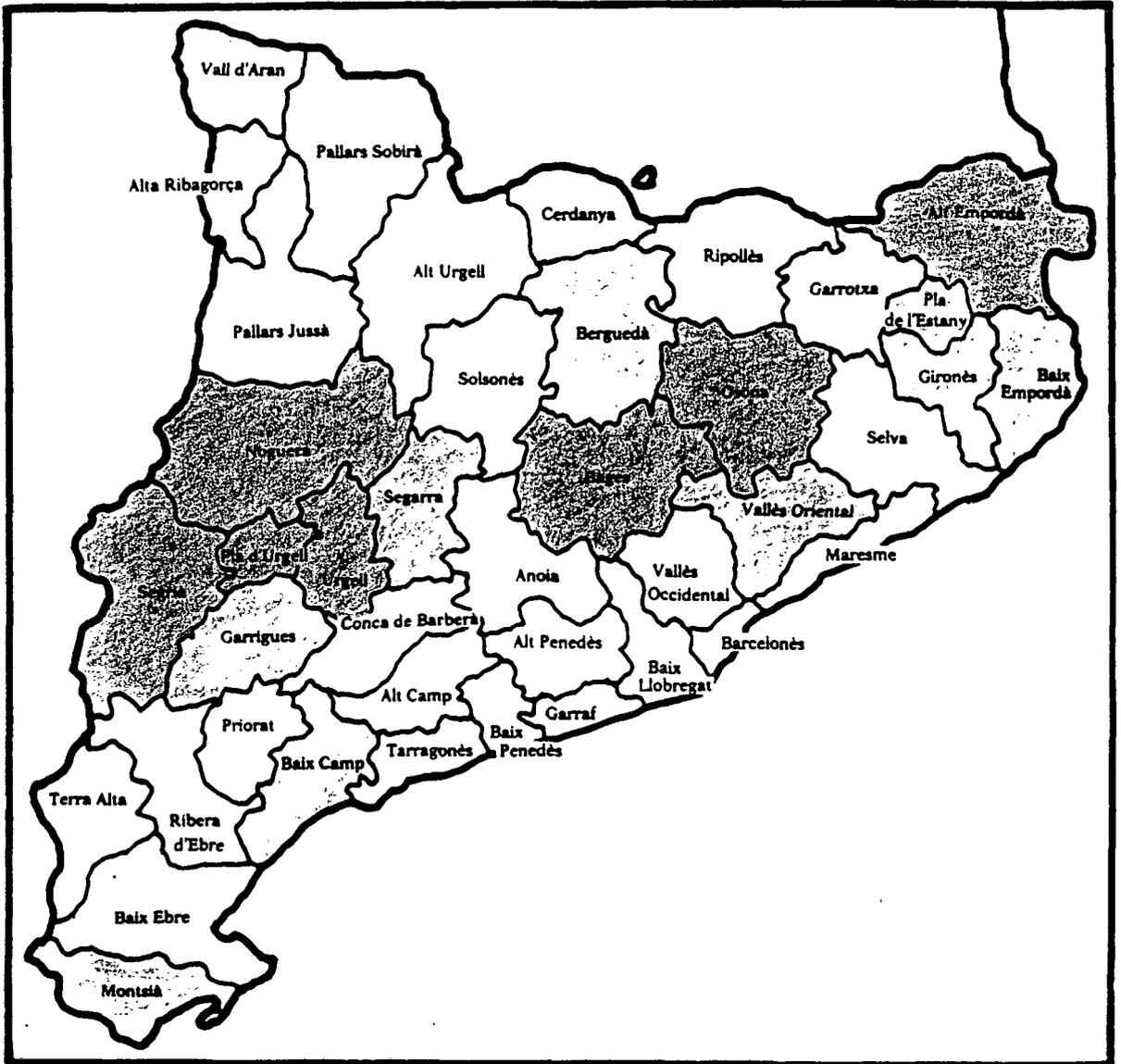
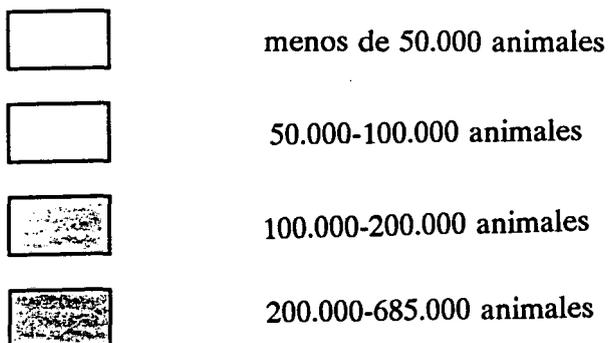


Figura 2: Censo total de porcino por comarca.



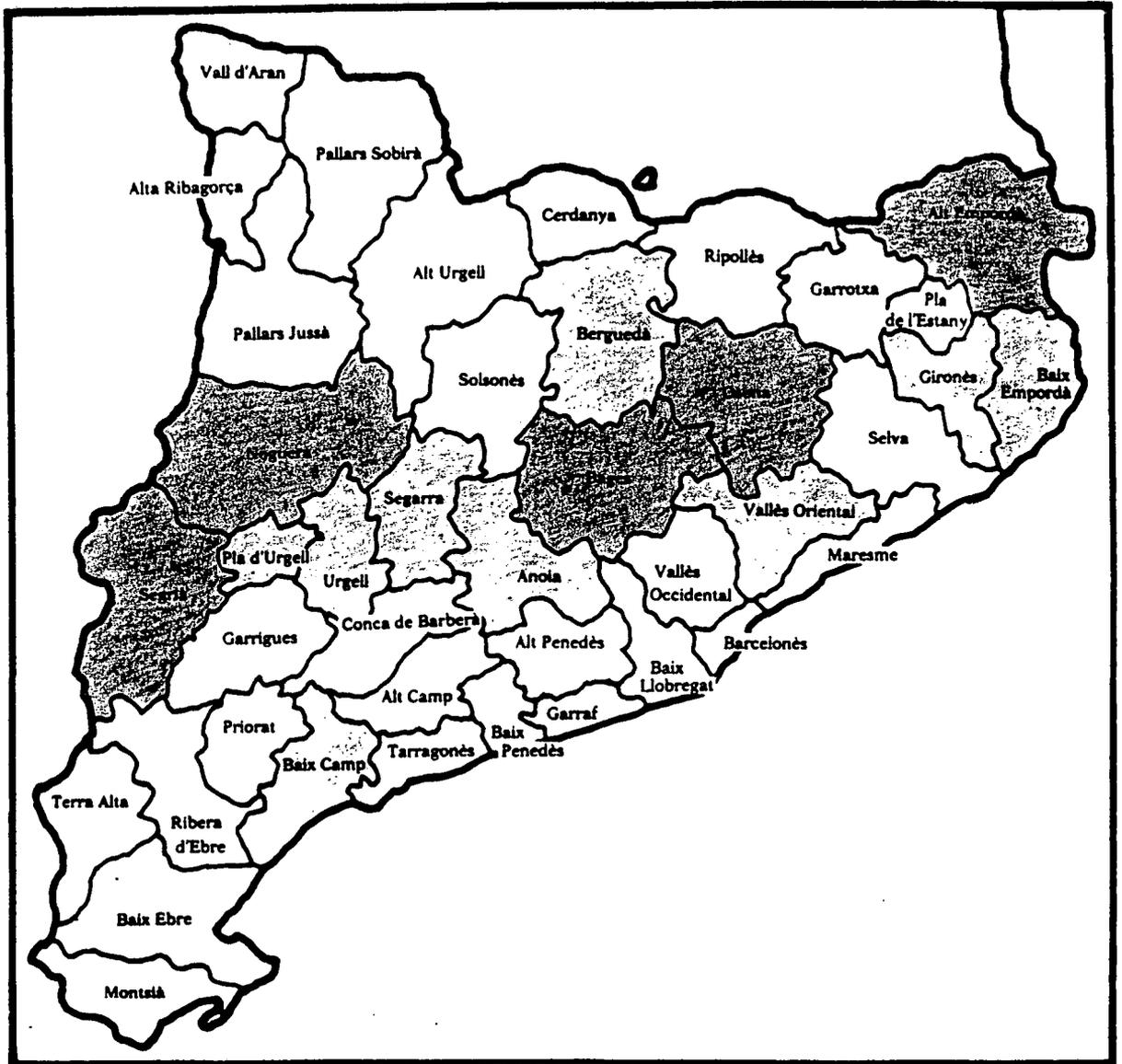


Figura 3: Censo total de reproductoras por comarca.

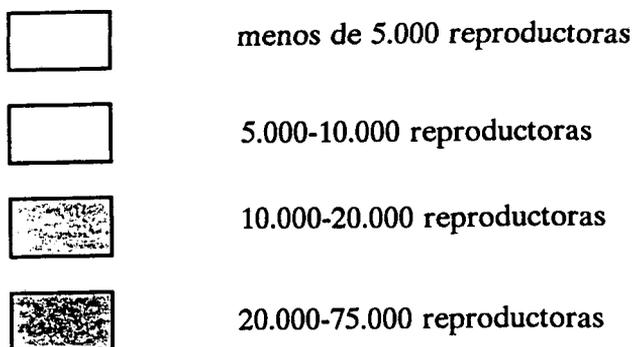




Figura 4: Número total de explotaciones de reproductoras por comarca.

### **3.2. MUESTRAS DE SUERO**

Las muestras de suero obtenidas a partir de animales reproductores son de gran interés para llevar a cabo los estudios epidemiológicos. Al permanecer varios años en la granja, estos animales tienen mayores probabilidades de entrar en contacto con cualquier agente infeccioso, y, por tanto, se consideran los mejores indicadores del paso de una infección en la población que es objeto de estudio.

Si lo que se pretende es detectar una infección reciente en una población resulta más interesante escoger muestras de lechones a partir de 2 meses de vida, ya que a esta edad han perdido la inmunidad calostrada y la detección de anticuerpos circulantes indicaría una infección reciente en los animales.

Para realizar el estudio epidemiológico se planteó la elaboración de tres muestreos complementarios:

A) En primer lugar, se llevó a cabo una encuesta preliminar en animales de desvieje, con la única finalidad de calcular la prevalencia inicial, dato necesario para poder determinar el tamaño de la muestra en la encuesta epidemiológica posterior.

B) Para conocer la distribución del CVRP y el VGET en Cataluña se realizó un segundo muestreo en las explotaciones de reproductores.

C) Por último, con el fin de establecer en qué momento el nuevo coronavirus porcino apareció en Catalunya y determinar la evolución de la infección por CVRP/VGET a lo largo de varios años, se utilizó una colección de sueros conservados a  $-20^{\circ}\text{C}$  y obtenidos de lechones de ocho semanas de vida.

#### **3.2.1. MUESTRAS DE SUERO DE ANIMALES DE DESVIEJE**

Ante la ausencia de datos recientes acerca de las infecciones por CVRP/VGET en Catalunya se realizó una encuesta previa durante los meses de junio, julio y agosto de 1990. Se utilizaron 125 muestras de suero de cerdas de desvieje, recogidas en el momento del sacrificio en un matadero industrial situado en la provincia de Barcelona. Al matadero llegaban animales de diferentes puntos de España, pero se recogieron muestras de sangre sólo de los procedentes de comarcas catalanas.

De las 115 muestras positivas a CVRP/VGET se examinó una submuestra de 66 animales para comprobar la presencia de anticuerpos específicos frente al VGET. El número y procedencia de los animales está indicado en la Tabla IV.

COMARCA	SUEROS ENCUESTA ANTI-CVRP	SUEROS ENCUESTA ANTI-VGET
BAIX CAMP	26	8
OSONA	16	9
SOLSONES	24	10
OTRAS COMARCAS	59	39
<b>TOTAL</b>	<b>125</b>	<b>66</b>

Tabla IV: Muestras de animales de desvieje.

Una vez contrastadas con sueros de referencia, algunas de estas muestras se emplearon como sueros testigos (positivo o negativo) en las pruebas inmunoenzimáticas, lo que además nos permitió comprobar la repetitividad de los resultados en estas técnicas.

### 3.2.2. MUESTRAS DE SUERO DE REPRODUCTORAS

Para realizar la encuesta epidemiológica se tuvo en cuenta el censo de granjas porcinas elaborado por el D.A.R.P. durante el año 1988, en el que se especifica el número de explotaciones por comarca. En este censo, las granjas están clasificadas en nueve estratos, numerados del 0 al 8, según el número de reproductores que contengan.

Se hizo un muestreo estratificado en función del número de reproductores por explotación, para poder comparar las posibles diferencias de los resultados según el tamaño de la granja. En nuestro estudio se consideraron tres estratos:

- Estrato pequeño (P), granjas de tipo tradicional con menos de 20 animales reproductores, correspondiéndose con los estratos 1 y 2 del censo porcino. El estrato 0 incluye granjas con menos de 5 animales y no se incluyó en nuestro estudio para facilitar la recogida de muestras.
- Estrato mediano (M), entre 20 y 99 reproductores, incluyendo los estratos 3 y 4 del censo.
- Estrato grande (G), granjas con más de 100 reproductores, equivalente al conjunto de los estratos 5, 6, 7 y 8 del censo.

El número total de explotaciones en las comarcas incluidas en el estudio, según los datos del censo porcino, se indica en la tabla V, clasificadas según el estrato correspondiente.

Nº DE EXPLOTACIONES				
COMARCA	P	M	G	TOTAL
ALT CAMP	0	45	27	72
ALT EMPORDA	425	271	52	748
ALT URGELL	82	32	0	114
ANOIA	99	111	32	242
BAGES	391	325	79	795
BAIX CAMP	0	88	61	149
BAIX EMPORDA	264	150	38	452
BERGUEDA	202	145	43	390
GARRIGUES	0	60	49	109
GARROTXA	196	70	0	266
GIRONES	170	95	35	300
LA SELVA	72	44	25	141
NOGUERA	486	509	105	1.100
OSONA	821	780	217	1.818
PALLARS - JUSSA	142	137	43	322
PLA D'URGELL	181	186	44	411
PLA DE L'ESTANY	222	114	0	336
RIBERA D'EBRE	0	30	21	51
SEGARRA	109	165	47	321
SEGRIA	356	630	155	1.141
SOLSONES	208	132	21	361
URGELL	180	202	42	424
VALLES OCCIDENTAL	79	80	23	182
VALLES ORIENTAL	251	167	45	463
<b>TOTAL</b>	<b>4.936</b>	<b>4.568</b>	<b>1.204</b>	<b>10.708</b>

Tabla V: Censo de granjas de reproductoras por estrato y comarcas. P: estrato pequeño (5 - 19 rep.); M: estrato mediano (20 - 99 rep.); G: estrato grande (> 100 rep.).

### 3.2.2.1. Muestreo de las explotaciones

Para calcular el número de explotaciones que debía contener la muestra de cada estrato, se tuvieron en cuenta los valores de prevalencia obtenidos en el estudio preliminar con sueros de matadero (92% para el CVRP/VGET y 29% para el VGET). La precisión deseada fue del 4% para detectar la infección por el CVRP/VGET y del 6% para el VGET, y el nivel de confianza fue del 95% para ambas.

Con el fin de obtener una muestra que se ajustase a estos valores se calcularon 187 explotaciones para cada uno de los estratos P y M y 168 para el estrato G. Este tamaño de muestra debía permitir extrapolar los resultados a la población total de granjas, con una precisión del 3,5% para la infección por el VGET, y del 2,4% para la infección por CVRP/VGET, considerando las prevalencias de la encuesta previa y un nivel de confianza del 95%. La fracción de la encuesta fue del 3,2%, 4,8% y 14,9% para los estratos P, M y G respectivamente, y del 4,9% respecto al total de granjas.

En el muestreo por comarcas, se asignó a cada una de ellas un número de granjas que fuera proporcional al número total existente en cada comarca y para cada estrato. Para facilitar la obtención de muestras se descartaron del estudio aquellas comarcas que tuvieran un número de granjas inferior al 1% del número total de explotaciones para cada estrato (en total 17 comarcas) y aquellas que dieron como resultado sólo un estrato para estudiar (dos comarcas: Alt Penedès y Conca de Barberà).

En la tabla VI se expresa el número de granjas muestreadas, con algunas variaciones finales respecto al planteamiento inicial, que dependieron de la oportunidad en el momento de recoger las muestras en los laboratorios.

### 3.2.2.2. Cálculo del número de muestras por explotación

El número de muestras para analizar en cada explotación de los estratos M y G se calculó en 7-8 sueros, según el tamaño de la granja de procedencia, número suficiente para detectar un positivo en caso de que existiera la infección en la granja, con un nivel de confianza del 95% y suponiendo una prevalencia de infección por CVRP/VGET en la explotación, del 33% como mínimo. En las explotaciones del estrato P el número de muestras necesarias fue inferior a 6 para el mismo nivel de confianza.

La recogida de los sueros y de los datos correspondientes a las explotaciones de origen fue facilitada por los laboratorios comarcales del D.A.R.P. En las granjas pequeñas el número de muestras disponibles fue en algún caso inferior al calculado, pero siempre se obtuvieron como mínimo dos sueros de cada explotación.

Nº DE EXPLOTACIONES

COMARCA	P	M	G	TOTAL
ALT CAMP	1	3	5	9
ALT EMPORDA	16	11	4	31
ALT URGELL	1	1	0	2
ANOIA	4	6	6	16
BAGES	11	11	11	33
BAIX CAMP	0	4	1	15
BAIX EMPORDA	12	16	3	31
BERGUEDA	7	6	6	19
GARRIGUES	0	4	5	9
GARROTXA	8	6	0	14
GIRONES	7	4	4	15
LA SELVA	7	7	5	19
NOGUERA	19	31	15	65
OSONA	30	31	31	92
PALLARS - JUSSA	0	0	2	2
PLA D'URGELL	7	9	4	20
PLA DE L'ESTANY	7	6	1	14
RIBERA D'EBRE	0	1	5	6
SEGARRA	4	7	6	17
SEGRIA	9	26	18	53
SOLSONES	9	6	3	18
URGELL	8	8	7	23
VALLES OCCIDENTAL	5	10	6	21
VALLES ORIENTAL	10	9	6	25
<b>TOTAL</b>	<b>182</b>	<b>223</b>	<b>164</b>	<b>569</b>

Tabla VI: Muestreo de granjas de reproductoras. P: estrato pequeño (5 - 19 rep.); M: estrato mediano (20 - 99 rep.); G: estrato grande (> 100 rep.).

### 3.2.3. MUESTRAS DE SUERO DE LECHONES

Con el fin de llevar a cabo diversos estudios relacionados con la producción porcina, se habían venido recogiendo, a lo largo de varios años, sueros de lechones de 8 semanas de edad procedentes de explotaciones con un buen nivel sanitario localizadas en distintas comarcas de las provincias de Barcelona, Girona y Lleida. Una parte de cada suero se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se clasificaron atendiendo a la fecha de recogida de la muestra.

De esta colección de sueros, se seleccionaron 464, obtenidos durante el periodo comprendido entre mayo de 1985 (los más antiguos que fue posible encontrar) y julio de 1989. Estas muestras se recogieron en un centro destinado a probar reproductores (denominado "granja 1") y que recibía periódicamente animales procedentes de otras explotaciones porcinas de toda Catalunya para ser contrastados. En el caso de que llegara una hembra gestante se conservaba hasta el momento del parto y sus lechones se mantenían en el centro durante todo el periodo de cebo. Las peculiares características de esta granja eran, a nuestro modo de ver, idóneas para el estudio retrospectivo, ya que en caso de existir alguna de las dos infecciones se detectaría más fácilmente en la población.

Desde mayo de 1985 hasta diciembre de 1986 se escogieron 424 muestras para realizar el estudio retrospectivo (tabla VII).

	FECHA DE RECOGIDA	NUMERO DE MUESTRAS
1985	MAYO	52
	JULIO	29
	NOVIEMBRE	50
	DICIEMBRE	28
1986	ENERO	46
	MARZO	25
	ABRIL	28
	JUNIO	56
	SEPTIEMBRE	27
	OCTUBRE	35
	NOVIEMBRE	23
	DICIEMBRE	26
	TOTAL	424

Tabla VII: Estudio retrospectivo con sueros de la granja 1.

El estudio retrospectivo se complementó con las otras 40 muestras recogidas en la granja 1 hasta julio de 1989 (tabla VIII) y con 80 muestras más de lechones procedentes de seis explotaciones, todas con un buen nivel sanitario y localizadas en diferentes comarcas catalanas, lo que permitió hacer un seguimiento más amplio en la población. Para ello se escogieron los sueros según la fecha de obtención de la muestra, durante un espacio de tiempo comprendido entre abril de 1987 y enero de 1989. En la figura 5 aparecen los diferentes periodos de tiempo estudiados para cada granja y el número de muestras recogidas de cada una en total. Las granjas 2, 3 y 4 suministraron animales a la granja 1 en diferentes momentos del periodo estudiado, pero se han incluido como muestras de la granja 1.

	PERIODO ESTUDIADO	NUMERO DE MUESTRAS
1987	ENERO - MARZO	3
	ABRIL - JUNIO	4
	JULIO - SEPTIEMBRE	2
	OCTUBRE - DICIEMBRE	10
1988	ENERO - MARZO	4
	ABRIL - JUNIO	5
	OCTUBRE - DICIEMBRE	4
1989	ENERO - MARZO	3
	ABRIL - JUNIO	4
	TOTAL	40

Tabla VIII: Seguimiento de anticuerpos anti-CVRP en la granja 1.

--- GRANJA 1-----	n = 424	----- n = 40-----
-----		-----
----- GRANJA 2-----	n = 20	-----
-----		-----
----- GRANJA 3-----	n = 24	-----
-----		-----
----- GRANJA 4-----	n = 23	-----
-----		-----
----- GRANJA 5 -----	n = 4	-----
-----		-----
----- GRANJA 6-----	n = 4	-----
-----		-----
----- GRANJA 7-----	n = 5	-----
-----		-----

5 6 7 8 9 10 11 12	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12	1 2 3 4 5 6 7
1985	1986	1987	1988	1989

Figura 5: Estudio retrospectivo en lechones en diversas granjas.

### 3.3. ANALISIS ESTADISTICO

Se utilizó el paquete de programas Epi-Info, versión 5<sup>1</sup>, para elaborar la base de datos (programa EPED y programa ANALYSIS), calcular el tamaño de la muestra en los diferentes apartados señalados (programa STATCALC) y realizar el análisis estadístico de los resultados (programa ANALYSIS).

Para calcular el tamaño de muestra necesario se aplicó la fórmula (82):

$$n = \frac{N}{1 + (N-P)}$$

siendo  $n$  = tamaño de la muestra  
 $N$  = tamaño de la muestra para una población infinita  
 $P$  = número de individuos de la población

La muestra para una población infinita ( $N$ ) se determinó mediante la fórmula:

$$N = Z^2 \frac{P \cdot q}{D^2}$$

siendo  $Z$  = 1.96 para un nivel de confianza del 95%  
 $p$  = prevalencia esperada  
 $q$  = 1-p  
 $D$  = nivel de precisión

---

<sup>1</sup>Dean, AD, Dean, JA, Burton AH, Dicker RC. Epi Info, Version 5: a word processing, database, and statistics program for epidemiology on micro-computers. USD, Incorporated, Stone Mountain, Georgia, 1990.

### 3.4. TECNICAS LABORATORIALES PARA EL DIAGNOSTICO SEROLOGICO

Para determinar la seroprevalencia de la infección por CVRP/VGET se escogió el ELISA de inmunocaptura, descrito por Lanza *et al.* (90).

De cada granja positiva se tomó una muestra de dos sueros para realizar un ELISA diferencial capaz de discernir los anticuerpos específicos frente a VGET. En este caso se utilizó la prueba descrita por Callebaut *et al.* (24) con algunas modificaciones introducidas por Lanza (87).

#### 3.4.1. OBTENCIÓN DEL ANTÍGENO PARA ELISA

Se empleó un antígeno concentrado obtenido a partir del sobrenadante de cultivo de células de testículo porcino (línea celular ST) infectadas con el VGET, cepa Purdue-115. Este antígeno es fácil de elaborar, no precisa purificación y las cantidades obtenidas permiten estudiar un gran número de muestras por ELISA.

La cepa vírica fue facilitada por J. Plana (Laboratorios Cyanamid-Sobrino, La Vall de Bianya-Olot), y como inóculo se utilizó el sobrenadante de cultivos celulares infectados con el virus y conservados en alícuotas a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### **Preparación de cultivos de células ST.**

La multiplicación del virus de la GET se llevó a cabo sobre la línea celular ST de testículo de cerdo (100).

Para el mantenimiento de las células ST se utilizó Dulbecco's MEM (GIBCO) con 1 g/l de glucosa. El medio deshidratado se reconstituyó con agua desmineralizada y desionizada (sistema milli-Q de MILLIPORE) al que se le añadió 0,85 g/l de bicarbonato sódico siguiendo las instrucciones del fabricante. Al medir el pH se ajustó a un valor por debajo del pH final (7.00-7.4), ya que después de filtrar el medio ese valor aumenta ligeramente. El medio llevaba incorporado un indicador (rojo fenol) para controlar el pH visualmente y cuando fue necesario corregirlo se utilizaron soluciones estériles de NaOH 1N o ClH 3%

El medio de cultivo se esterilizó por filtración a través de un filtro Sterivex-GS (MILLIPORE) de 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro y se añadió una solución de 100 U.I./ml de penicilina y 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de estreptomycin (FLOW) antes de usarlo.

Para la obtención del tapiz celular se empleó este medio de cultivo adicionado de 10% de suero fetal bovino (GIBCO), inactivado a 56°C durante treinta minutos y conservado a -20°C hasta su empleo.

### **Infección de los cultivos**

Las células se mantuvieron en estufa a 37°C, en frascos de 75 cm<sup>2</sup> (COSTAR) hasta obtener una monocapa de células confluentes, a las 48-72 horas. En ese momento se eliminó el medio de crecimiento, se lavó tres veces el tapiz celular con PBS-CMF (libre de calcio y magnesio) y se inoculó 1 ml de suspensión del virus de la GET. Los frascos se pusieron en la estufa a 37°C y, cada quince minutos aproximadamente, se mecieron para repartir homogéneamente el virus por el tapiz celular y favorecer la infección.

Al cabo de hora y media o dos horas se añadió el medio de mantenimiento, consistente en el mismo medio de cultivo utilizado para el crecimiento de las células, pero sin suero fetal bovino, y se incubaron 48 horas más a 37°C. Los frascos se observaron al cabo de 24 y 48 horas en un microscopio invertido hasta comprobar que el efecto citopático era del 80-90%, consistente en redondeamiento de las células, aparición de núcleos refringentes y desprendimiento del tapiz. Los cultivos se sometieron a un proceso de congelación a -20°C y descongelación a temperatura ambiente.

A continuación se reunió todo el medio infectado en un vaso de precipitado colocado en un baño de hielo y se sometió a tres ciclos de ultrasonidos de diez segundos cada uno, en un aparato BRANSON B-12 conectado a media potencia, con el fin de romper la pared celular y permitir la liberación del virus sin dañar su estructura.

Seguidamente se centrifugó a bajas revoluciones (2.500 rpm durante diez minutos) para eliminar la mayor cantidad posible de restos celulares, y se almacenó a -20°C.

### **Concentración del virus**

El sobrenadante almacenado se descongeló a temperatura ambiente y en la oscuridad para impedir que la luz pudiera inactivar el virus. Se llenaron ocho tubos para proceder a la concentración del virus en una ultracentrífuga BECKMAN L8-70M con un rotor 70Ti, a 100.000 g (31.000 rpm) durante una hora a 4°C. El sedimento obtenido en cada tubo se resuspendió con 1 ml de PBS-CMF durante una noche a 4°C. Finalmente, se reunieron todas las suspensiones en un solo tubo que se colocó en un baño de hielo y se sometió a cuatro ciclos de ultrasonidos de diez segundos con el aparato conectado a media potencia.

El volumen de la suspensión obtenida se duplicó añadiendo la misma cantidad de glicerol para conservarlo en estado líquido congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . El antígeno así obtenido estuvo ya dispuesto para ser titulado por ELISA.

### **Titulación del antígeno**

Para determinar la dilución óptima del antígeno obtenido en cada lote, se hicieron diferentes diluciones, desde 1/10 hasta 1/320, en PBS pH 7,2, con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 0,2% de tween-80 y se utilizaron en un ELISA de inmunocaptura empleando sueros de control conocidos. Se eligió aquella dilución que dió la máxima diferencia entre el suero positivo y el negativo y detectó el positivo débil dando una absorbancia superior a 0.100.

### **3.4.2. ELISA DE INMUNOCAPTURA**

El ELISA de inmunocaptura se realiza en placas de poliestireno de 96 pocillos, tapizadas con dos anticuerpos monoclonales (Acm) producidos contra la cepa Purdue del virus de la GET, lo que permite utilizar un antígeno semipurificado como el descrito anteriormente. El antígeno se fija a la placa de forma específica, de modo que al efectuar el lavado tras la incubación, se elimina la mayor parte de impurezas procedentes de los restos celulares. Esta prueba se empleó para detectar sueros positivos a CVRP/VGET.

### **Metodología**

Los principales pasos de la técnica están esquematizados en la figura 7.

El tapizado de la placa (NUNC MAXISORP) se realizó con una mezcla a partes iguales de dos anticuerpos monoclonales (77):

- 6AC3: Acm neutralizante, dirigido contra el sitio antigénico A, subsitio C de la proteína S del VGET, compartido por coronavirus del grupo del VGET.

- 1DB12: Acm no neutralizante, dirigido contra el sitio antigénico B de la proteína S, específico del VGET.

Los Acm se diluyeron a 1/20.000 en tampón carbonato-bicarbonato pH 9,6 y se dispensaron 100  $\mu\text{l}$ /pocillo.

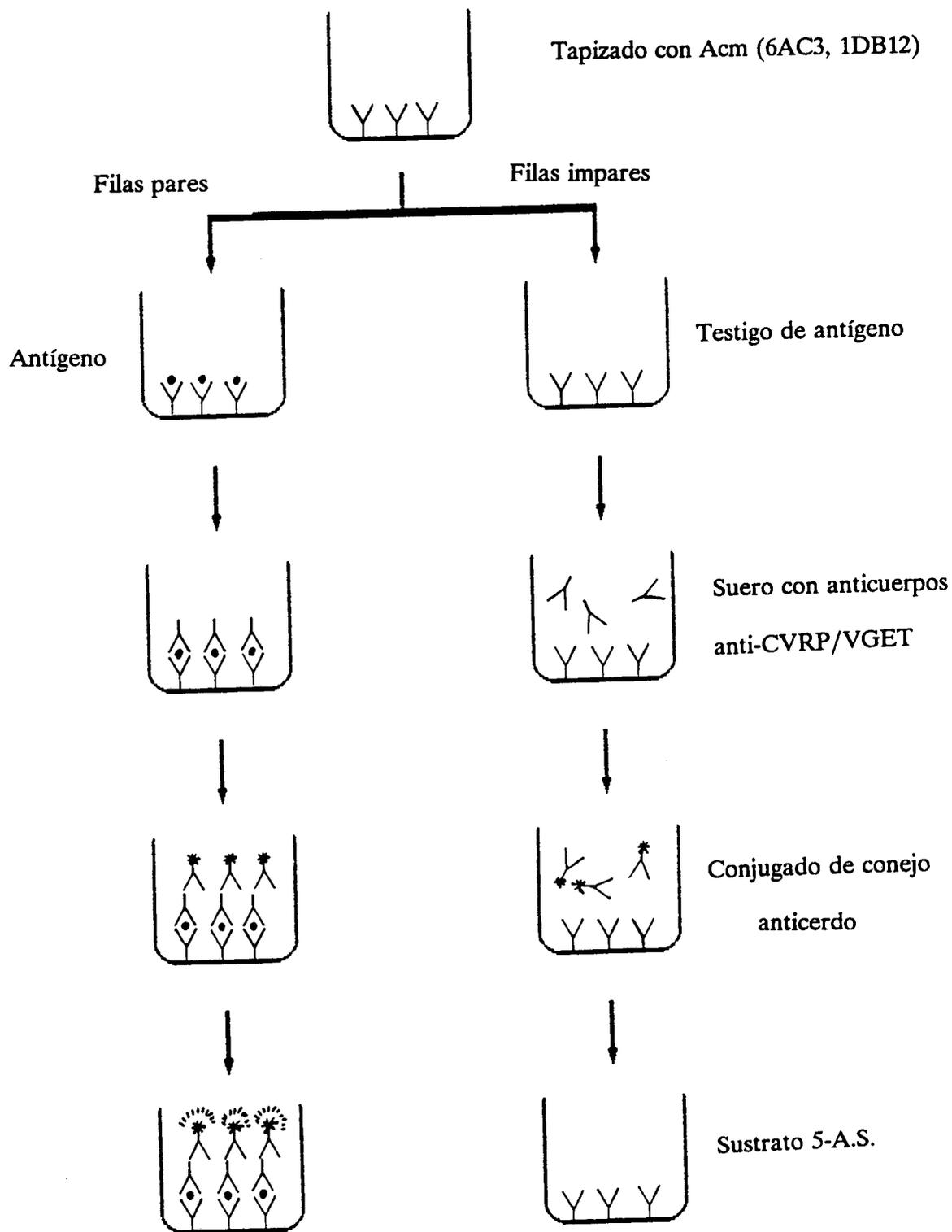


Figura 7: Esquema de la metodología del ELISA de inmunocaptura

Tras la incubación en estufa a 37°C toda la noche con la placa sellada, se realizaron tres lavados con una solución de agua destilada más 0,01% de tween-80, antes de añadir el antígeno y el control de antígeno en filas alternadas. Los lavados se realizaron utilizando un lavador de microplacas (TITERTEK) que dispensaba y succionaba la solución de lavado automáticamente.

Como testigo de antígeno se utilizó el tampón de dilución a base de PBS de pH 7,2, 11% de SFB y 0,2% de tween-80.

En cada pocillo de las columnas 4, 6, 8, 10 y 12 se añadieron 100 µl de antígeno así como a los pocillos A hasta D de la columna 2. La misma cantidad de testigo de antígeno se depositó en las columnas 1, 3, 5, 7, 9 y 11, y en los pocillos E hasta H de la columna 2.

La placa así preparada se dejó incubar durante cinco horas en un baño de agua a 37°C y después se lavó cuatro veces con la solución de lavado.

Los sueros se diluyeron en una placa aparte antes de añadirlos a la placa de ELISA con antígeno. Para ello se pusieron en cada pocillo 30 µl de PBS y 10 µl de cada uno de los sueros problema y de los sueros testigo, obteniendo la dilución de suero de 1/4. Después se inactivaron a 56°C en baño maría durante treinta minutos y las placas se centrifugaron a 3.000 rpm durante quince minutos para clarificar los sueros. Esto fue particularmente útil en el caso de sueros hemolíticos.

Tras la incubación del antígeno se depositaron en cada pocillo 90 µl de tampón de dilución de sueros, consistente en PBS 0,5 M ClNa con un 10% de SFB y un 1% de tween-80, y a continuación se añadieron 10 µl de cada suero diluido a 1/4, de forma que la dilución final en la placa de ELISA fue de 1/40.

En cada placa se incluyeron cuatro sueros testigo, dos positivos y dos negativos, colocados en la columna 2, en los pocillos A a D con antígeno y en los pocillos E a H con testigo de antígeno. La columna 1 sirvió para hacer de blanco en la lectura y sólo se puso tampón de dilución de sueros. En el resto de columnas se colocaron los sueros problema, uno por cada dos pocillos contiguos con antígeno y con testigo de antígeno. Un esquema de la disposición de los reactivos, sueros problema y sueros control está representado en la figura 8.

La placa con los sueros se incubó en baño a 37°C durante dos horas y transcurrido este tiempo se lavó cuatro veces.

Antes de añadir el conjugado de conejo anti-cerdo marcado con peroxidasa (RASw/IgG H+L/PO, NORDIC) se tituló probando diluciones de 1/1.500 a 1/4.000. La dilución más adecuada fue de 1/2.000 usándose el mismo tampón que para los sueros.

La placa con el conjugado se incubó una hora y después se lavó seis veces.

Como sustrato enzimático se empleó peróxido de hidrógeno al 0,005% y como cromógeno ácido 5-amino salicílico en tampón fosfato-EDTA. La solución se preparó inmediatamente antes de usarla mezclando 110  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,05% con 11 ml de 5-amino salicílico (1 mg/ml).

La placa se dejó incubando toda la noche a 4°C y, antes de leer los resultados, se agitó durante quince minutos en la oscuridad para homogeneizar el color en los pocillos. La lectura se realizó en un espectrofotómetro para microplacas (MULTISKAN-II) a 450 nm tomando como blanco la columna 1.

### **Interpretación**

El valor ELISA de cada suero se calculó como la diferencia entre la absorbancia obtenida en el pocillo con antígeno y el pocillo con testigo de antígeno.

El valor umbral de este ELISA de inmunocaptura es de 0.100, es decir, aquellos sueros con un valor ELISA igual o por encima del umbral se consideraron positivos al CVRP/VGET y por debajo de este valor negativos (90).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	*	++	sp <sub>1</sub>	sp <sub>1</sub>								
B	*	+	sp <sub>2</sub>	sp <sub>2</sub>								
C	*	-	sp <sub>3</sub>	sp <sub>3</sub>								
D	*	-	sp <sub>4</sub>	sp <sub>4</sub>								
E	*	++	sp <sub>5</sub>	sp <sub>5</sub>								
F	*	+	...	...								
G	*	-									...	...
H	*	-									sp <sub>40</sub>	sp <sub>40</sub>

Figura 8: Disposición de los sueros testigo y problema en ELISA de inmunocaptura

\*: Blanco de la placa con PBS-Tween 80; ++: Suero positivo fuerte a CVRP/VGET; sp<sub>1</sub>...sp<sub>40</sub>: sueros problema; +: Suero positivo débil a CVRP/VGET; -: Suero negativo a CVRP/VGET

### 3.4.3. ELISA DIFERENCIAL

Con el ELISA de inmunocaptura, al igual que con la prueba clásica de seroneutralización, es imposible diferenciar qué sueros son positivos al VGET, por lo que se hace necesario emplear una segunda prueba diferencial.

La obtención y caracterización de anticuerpos monoclonales dirigidos a diferentes epitopos del VGET (22, 77) ha permitido el desarrollo de un ELISA de competición para unirse a un epitopo específico del VGET, entre los anticuerpos presentes en el suero y un anticuerpo monoclonal dirigido contra ese sitio antigénico característico del VGET (24).

En este caso se utilizó el monoclonal 1DB12 que reconoce un epitopo de la proteína S del VGET que no aparece en las cepas de CVRP estudiadas hasta el momento (135). Los sueros positivos al VGET compiten con el monoclonal por la unión con el sitio antigénico, mientras que los sueros positivos al CVRP carecen de anticuerpos dirigidos contra ese epitopo y por tanto no hay competencia en la unión del monoclonal con el antígeno.

#### **Purificación de las inmunoglobulinas porcinas anti-VGET.**

Para el tapizado de la placa se utilizaron IgG porcinas anti-VGET, conseguidas tras la purificación de un suero hiperinmune que se obtuvo a partir de la inoculación experimental de un lechón con la cepa Purdue de VGET. Este suero fue obtenido por el Dr. I. Lanza (Dpto. Patología Animal (Sanidad Animal), León) en un estudio anterior y nos facilitó amablemente el volumen restante.

#### **Preparación del suero**

El suero se adsorbió con un cultivo de células ST no infectadas y sometidas a un proceso de congelación-descongelación y tratamiento por ultrasonidos. Se mezclaron a partes iguales el suero y el cultivo de células, incubándose durante una hora a 37°C y en rotación continua. Seguidamente se centrifugó a 1.600 g durante quince minutos, se recogió el sobrenadante y se esterilizó a través de un filtro de 0,22 µm de diámetro. Finalmente, el pH se ajustó a 7,00 con tampón fosfato 20 mM.

#### **Preparación de la columna de cromatografía**

Para la fase estacionaria en la cromatografía de afinidad se utilizó *Protein G Sepharose 4 Fast Flow* (PHARMACIA 17 - 0618 -01), de alta afinidad para unirse a las IgG de origen porcino. Se tomaron aproximadamente 2 ml de proteína G y se pusieron

en una columna de 10 x 0,8 cm (BIO-RAD), previamente lavada con agua estéril.

Una vez compactada, la columna se equilibró con tampón fosfato 20 mM y se conectó a un monitor de absorbancia (GILSON HOLOCHROME), ajustado a una longitud de onda de 280 nm y a un colector de fracciones (GILSON), programado para recoger volúmenes de 2 ml.

Tras aplicar la muestra de suero, se observó en el cromatograma un primer pico correspondiente a las proteínas séricas no retenidas. Se procedió al lavado de la columna con solución tampón fosfato hasta que la absorbancia volvió a la línea base del gráfico.

Para conseguir la elución de las inmunoglobulinas unidas a la proteína G se provocó un cambio brusco de pH añadiendo tampón de elución pH 2,7. En ese momento el cromatograma registró un pico de absorbancia correspondiente al paso de las IgG. Para neutralizar la acidez del tampón empleado, se añadieron unas gotas de solución tris-HCl, pH 9, en los tubos correspondientes a las fracciones con IgG.

Las fracciones recogidas que presentaron mayor absorbancia se mezclaron y se diluyeron a 1/2 con glicerol, guardándose a -20°C hasta su utilización.

#### **Titulación de las IgG porcinas anti-VGET.**

La dilución óptima de IgG anti-VGET para el tapizado de las placas se determinó haciendo diluciones desde 1/20 hasta 1/3.200. A lo largo del estudio se utilizó una solución de IgG diluida a 1/320 en tampón carbonato-bicarbonato de pH 9,6.

#### **Metodología**

El desarrollo de la prueba puede dividirse en tres apartados principales, representados en la figura 9.

##### **1) Tapizado de placas**

Se utilizaron placas de alta capacidad de adsorción de proteínas (COSTAR HIGH BINDING). Se dispensaron 100 µl de las IgG específicas anti-VGET diluidas 1/320 en tampón carbonato-bicarbonato (pH 9,6) y se dejó incubar toda la noche en estufa a 37°C con la placa sellada.

Se lavó tres veces con una solución de lavado a base de PBS de pH 7,2 con 0.02% SFB y 0,01% de tween-80.

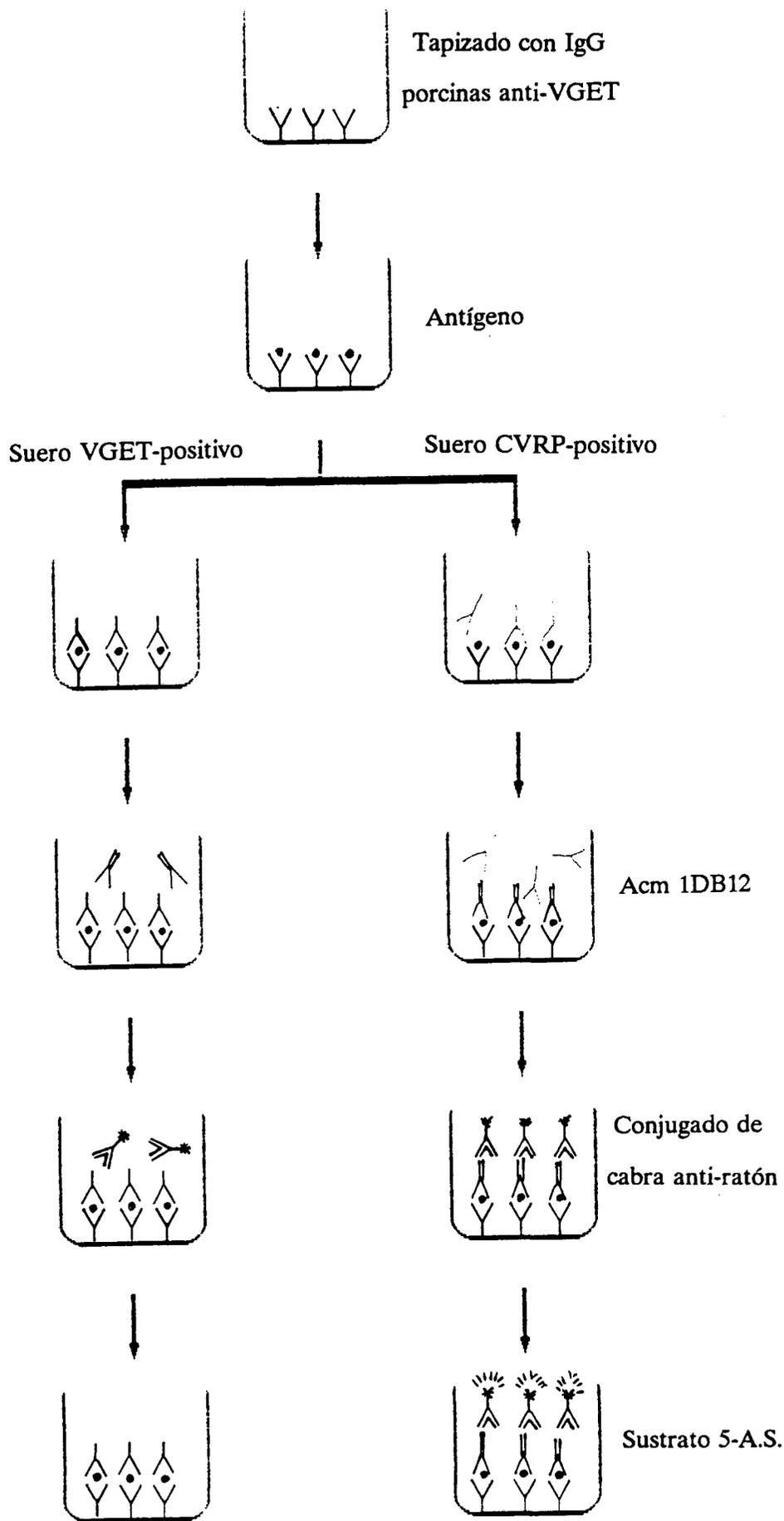


Figura 9: Esquema de la metodología del ELISA diferencial

## 2) Reacción antígeno-anticuerpo

En todos los pocillos se depositaron 100  $\mu$ l de antígeno diluido a su concentración óptima en PBS, 10% de SFB y 0,2% de tween-80, que resultó ser el doble de la utilizada en el ELISA de inmunocaptura, por lo que no fue necesario volver a titularlo cada vez que se preparó un lote de antígeno.

Se dejó en un baño de agua a 37°C durante tres horas con la placa sellada y se hicieron cuatro lavados.

Los sueros positivos en el ELISA de inmunocaptura y los sueros de control se inactivaron previamente a 56°C, durante treinta minutos y luego se centrifugaron a 3.000 rpm durante diez minutos para clarificarlos.

En la placa con antígeno ya lavada se añadió en cada pocillo:

- 10  $\mu$ l de SFB.
- 20  $\mu$ l de PBS 0,5 M ClNa con un 1% de tween-80.

Las tres primeras columnas se utilizaron como testigo:

-En la columna 1 se depositaron 20  $\mu$ l/pocillo, en dos pocillos contiguos, de un suero hiperinmune a VGET, un suero débilmente positivo a VGET, un suero positivo a CVRP y un suero negativo.

- En las columnas 2 y 3 se añadió un suero hiperinmune a VGET en diluciones dobles desde 1/20 a 1/2.560.

- En el resto de columnas de la 4 a la 12 se depositaron 20  $\mu$ l/pocillo de los sueros problema en dos pocillos contiguos. La dilución de cada suero fue de 1/2,5 en PBS salino, SFB y tween-80.

Se dejó la placa sellada toda la noche a temperatura ambiente y en oscuridad.

## 3) Etapa de bloqueo

Sin lavar la placa ni quitar los sueros, se añadió a cada pocillo 50  $\mu$ l de una solución de Acm 1DB12, diluido a 1/175.000 en PBS 0,5 M ClNa y 0,2% de tween-80. El volumen final por pocillo fue de 100  $\mu$ l y se doblaron las diluciones de los sueros problema (de 1/2,5 a 1/5) y del mAb (1/350.000).

Se procedió a la incubación durante noventa minutos a 37°C en baño maría y se lavó cuatro veces.

Se añadió el conjugado anti-monoclonal, obtenido en cabra, dirigido hacia las inmunoglobulinas de ratón y marcado con peroxidasa (Goat-anti Mouse IgG1/HRPO, NORDIC). La concentración óptima se determinó previamente por titulación de diluciones entre 1/2.000 y 1/4.000, dando los mejores resultados a 1/3.500. Como diluyente se empleó una solución de PBS 0,5 M ClNa, con un 0,2% de tween-80 y un 5% de suero de cerdo negativo a VGET/CVRP.

### **Lectura e interpretación**

Tras incubar la placa a 37°C durante una hora exactamente, se lavó la placa seis veces y se añadió el sustrato-cromógeno, siguiendo la misma pauta que la indicada para el ELISA de inmunocaptura.

La placa se dejó reaccionar a 4°C durante siete u ocho horas y antes de la lectura se agitó unos quince minutos.

Se tomaron como blanco de la placa los pocillos A1 y A2, los cuales contenían el suero hiperinmune positivo y que bloquearon completamente la unión del monoclonal al antígeno.

En cada placa de este ELISA, se calculó el valor umbral de los sueros positivos como el 45% de la absorbancia media obtenida en los pocillos con suero testigo al CVRP. El cálculo tiene en cuenta que para que un suero sea considerado positivo al VGET debe bloquear como mínimo un 55% la unión del Acm, y ya que los sueros positivos al CVRP pueden producir cierto bloqueo de la unión al ocupar otros sitios en la superficie antigénica del virus, en el cálculo del valor umbral se utilizó un suero positivo al CVRP con una absorbancia igual al promedio de la obtenida con una colección de sueros positivos al CVRP, pero no al VGET.

Si la media de las absorbancias de cada suero da un resultado inferior al valor umbral, se clasifica como positivo al VGET, y si es superior se considera positivo al CVRP, pero negativo al VGET.

<p>Valor umbral de la placa = <math>0,45 \times</math> absorbancia media del suero testigo positivo al CVRP</p>
---

## 4. RESULTADOS

#### 4.1. RESULTADOS DE LA ENCUESTA PRELIMINAR EN CERDAS DE DESVIEJE

De las 125 muestras de suero recogidas en matadero y examinadas por ELISA de inmunocaptura, 115 fueron positivas al CVRP/VGET, lo que representa un 92,0% de prevalencia a la infección por alguno de los dos coronavirus o por ambos simultáneamente.

Para comprobar la existencia o no de anticuerpos anti-VGET en la población estudiada, se seleccionaron 66 muestras a partir de los sueros positivos para analizarlas por ELISA diferencial. En este caso, 19 sueros (28,8%) fueron positivos específicamente al VGET.

Los resultados obtenidos en ambas pruebas y en relación con el origen de los animales se resumen en la tabla IX.

COMARCA	POSITIVOS al ELISA de inmunocaptura	POSITIVOS al ELISA diferencial
BAIX CAMP	24/26 (92,3%)*	2/8 (25,0%)
OSONA	10/16 (62,5%)	1/9 (11,1%)
SOLSONES	22/24 (91,7%)	3/10 (30,0%)
Otras	59/59 (100%)	13/36 (36,1%)
<b>TOTAL</b>	<b>115/125 (92,0%)</b>	<b>19/66 (28,8%)</b>

Tabla IX: Resultados al ELISA de inmunocaptura y al ELISA diferencial en cerdas de desvieje en relación al origen. \*: nº de positivos/nº sueros examinados y porcentaje.

Al carecer de otros datos en Catalunya, los resultados totales obtenidos en ambos ELISA se consideraron una estimación aproximada de la prevalencia por estas infecciones en la población, y a partir de ellos se calculó el tamaño de muestra necesario para realizar el estudio epidemiológico en granjas de reproductoras de Catalunya (ver 3.2.2.).

## 4.2. RESULTADOS AL ELISA DE INMUNOCAPTURA EN SUEROS DE REPRODUCTORAS

### 4.2.1. RESULTADOS GLOBALES

#### A) Prevalencia de infecciones por el CVRP/VGET.

Los sueros estudiados por ELISA de inmunocaptura se clasificaron como positivos o negativos en relación al valor umbral de la prueba, es decir, absorbancias netas iguales o superiores a 0.100 corresponden a sueros positivos, e inferiores a ese valor a sueros negativos.

De los 3734 sueros examinados, el 91,01% fueron positivos con un nivel de precisión de 0,9 %, lo que extrapolado a la población total de reproductoras de Catalunya (537.007 animales) supone una prevalencia de infección por el CVRP/VGET de 90,19-92,01 %

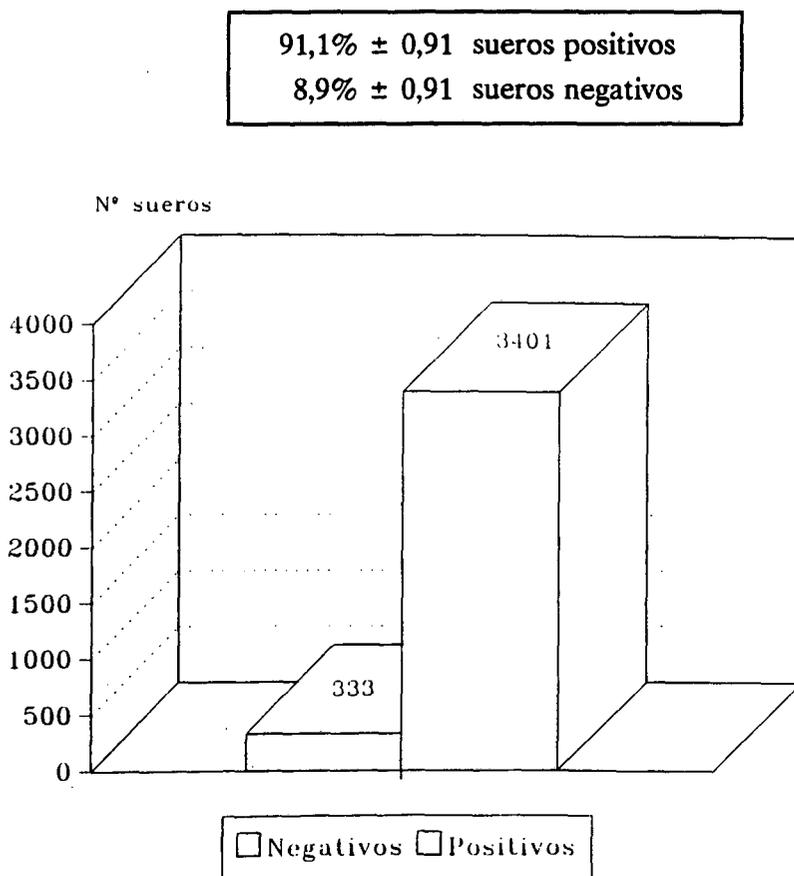


Figura 11: Prevalencia global de infección por el CVRP/VGET

B) Los diferentes valores de absorbancia obtenidos en las lecturas de los sueros estudiados por ELISA de inmunocaptura se agruparon arbitrariamente en rangos de absorbancia con incrementos de 0.200 entre cada uno. El número y el porcentaje de sueros positivos para cada rango de absorbancias, así como los sueros negativos se muestra en la tabla X.

	RANGO	FRECUENCIA
NEGATIVOS	< 0,100	333 (8,9%)
	0,100 - 0,299	343 (9,2%)
POSITIVOS	0,300 - 0,499	549 (14,7%)
	0,500 - 0,699	588 (15,7%)
	0,700 - 0,899	750 (20,1%)
	> 0,900	1171 (31,4%)

Tabla X: Rango de absorbancias, número y porcentaje de los sueros estudiados por ELISA de inmunocaptura.

En la figura 12 se representa la suma de sueros incluidos en cada rango de absorbancia. Se puede observar que la mayoría de los sueros negativos se acumulan en absorbancias bajas o negativas, inferiores a 0,030, es decir, se desvían hacia la izquierda. En cambio, los sueros positivos se desplazan hacia la derecha en absorbancias muy altas, superiores a 0,900, quedando pocas muestras alrededor del valor umbral de la prueba.

La absorbancia media de los sueros positivos es de 0,720, con una desviación estándar de 0,28. Los valores de absorbancia no siguen una distribución normal, por tanto se ha usado el test de Kruskal-Wallis para el análisis de la varianza de los valores de absorbancia con cada variable estudiada.

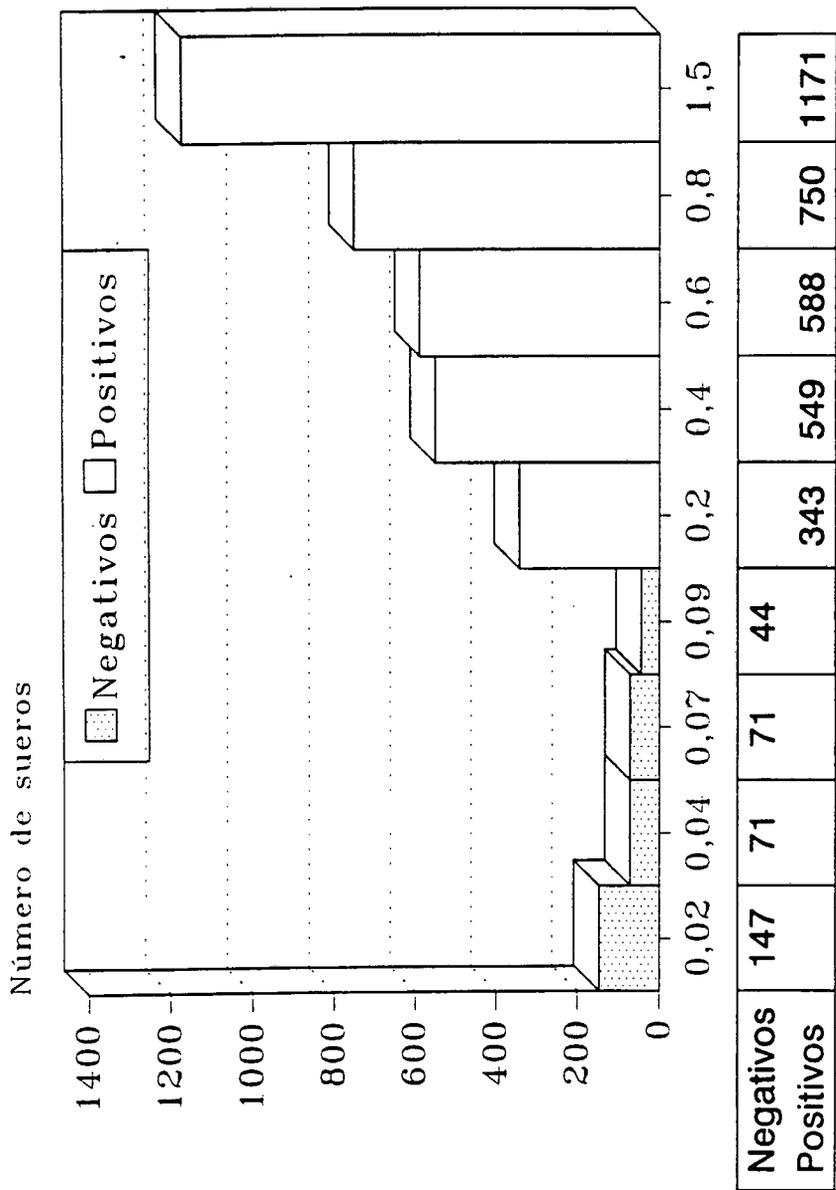


Figura 12: Número de sueros para cada rango de absorbancias en ELISA de inmunocaptura.

#### 4.2.2. RESULTADOS SEGÚN EL TAMAÑO DE LA EXPLOTACIÓN

##### A) Prevalencia de las infecciones por CVRP/VGET

Las prevalencias de los sueros clasificados según el tamaño de la explotación de origen se indican en la tabla XI y la figura 13. En ambas puede apreciarse que a medida que aumenta el tamaño de la granja se incrementa el porcentaje de sueros positivos con diferencias estadísticamente significativas. En la tabla XI se especifica la precisión calculada para los resultados de cada tipo de explotación.

	POSITIVOS	NEGATIVOS
G*	1245 (97,6%±0,8)	31 (2,4%)
M	1512 (91,3%±1,4)	144 (8,7%)
P	644 (80,3%±2,74)	158 (19,7%)

$$\chi^2 = 181,03 \quad p < 0,001$$

Tabla XI: Resultados al ELISA de inmunocaptura según el tamaño de la granja. \* G: granjas con más de 100 animales. M: granjas entre 20 y 100 animales. P: granjas con menos de 20 animales.

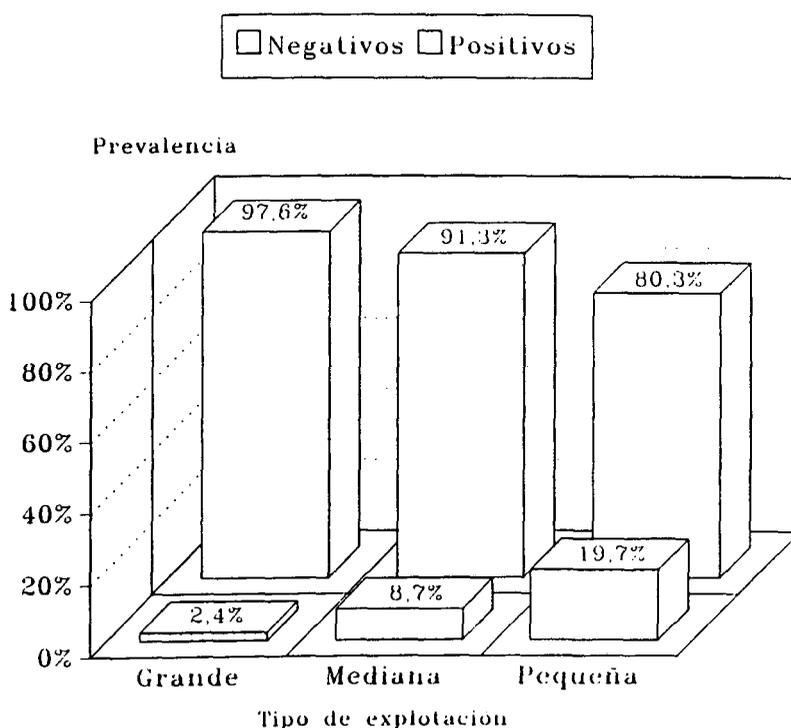


Figura 13: Prevalencia según el tamaño de la explotación.

La fuerza de asociación entre una variable determinada como factor de riesgo y la aparición o no de anticuerpos, se ha valorado mediante el riesgo relativo (R.R.) y la razón de ventajas más conocida como *odds ratio* (O.R.).

Se han calculado estos parámetros y sus intervalos correspondientes para un 95% de confianza, comparando los resultados de los sueros pertenecientes a cada tipo de explotación con todos los demás (tabla XII). Las granjas con más de 100 reproductoras tienen un riesgo relativo 1,11 de presentar animales positivos al CVRP/VGET, mientras que las granjas con menos de 20 animales tienen un riesgo relativo de 0,85, que al incluir intervalos inferiores a 1 supone que presentan menos infección que los otros grupos.

	R.R.		O.R.		$\chi^2$	
G*	1,11	(1,09-1,13)	5,60	(3,79-8,31)	98,63	p<0,001
M	1,00	(0,98-1,02)	1,05	(0,83-1,33)	0,14	p=0,7 (n.s.)
P	0,85	(0,82-0,88)	0,26	(0,20-0,33)	146,20	p<0,001

Tabla XII: Valores de R.R. y O.R., y sus intervalos correspondientes para un 95% de confianza, de la presentación de sueros positivos en cada tipo de explotación frente al resto. \* G: granjas con más de 100 animales; M: granjas entre 20 y 100 animales; P: granjas con menos de 20 animales.

### B) Absorbancias de los positivos

El análisis de la varianza de los niveles de absorbancia de los sueros positivos demuestra que también hay diferencias significativas según el tamaño de la explotación (tabla XIII, figura 14).

	Media	Desviación estándar
G*	0,73	0,282
M	0,70	0,277
P	0,72	0,289

H = 7,39    p<0,05

Tabla XIII: Análisis de la varianza para las absorbancias de los sueros positivos según el tamaño de la explotación. \* G: granjas con más de 100 animales; M: granjas entre 20 y 100 animales; P: granjas con menos de 20 animales.

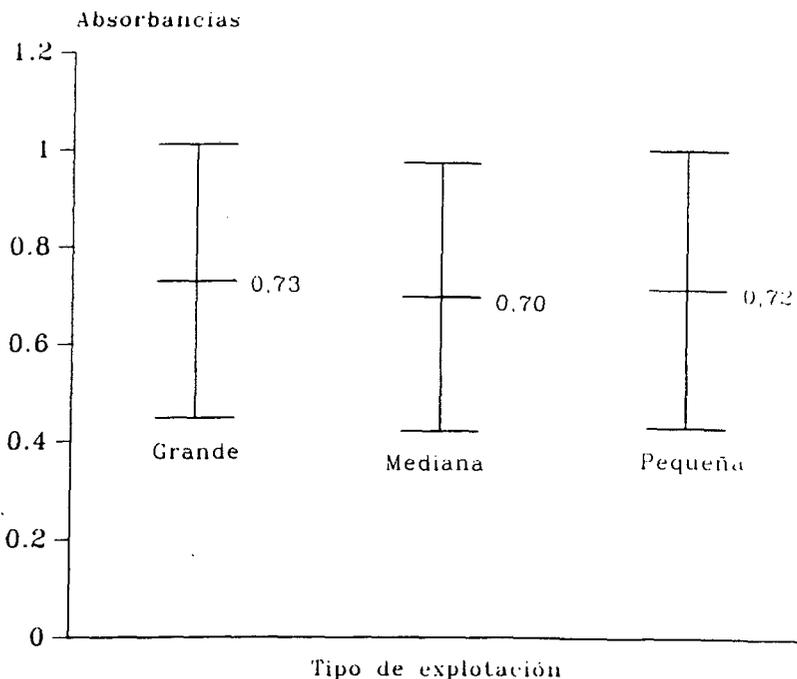


Figura 14: Absorbancia media estándar de los sueros para cada tipo de explotación y desviación.

Comparando entre sí los sueros de cada tipo de explotación se observa que sólo difieren en los niveles de absorbancia las granjas grandes respecto a las medianas (tabla XIV):

	G*	M	P
G*	-	6,97 <sup>1</sup>	0,160 <sup>2</sup>
M	-	-	2,595 <sup>2</sup>
P	-	-	-

Tabla XIV: Valores de la H de Kruskal-Wallis para las diferencias en las absorbancias de los sueros positivos según el tamaño de la explotación. \* G: granjas con más de 100 animales; M: granjas entre 20 y 100 animales; P: granjas con menos de 20 animales. <sup>1</sup> p<0,01; <sup>2</sup> n.s.

Al agrupar los sueros con absorbancias superiores o inferiores a la media también se observan estas diferencias (tabla XV).

	> 0,72	< 0,72
G*	731 (58,7%)	514 (41,3%)
M	789 (52,2%)	723 (47,8%)
P	352 (54,7%)	292 (45,3%)

$$\chi^2 = 11,82 \quad p < 0,01$$

Tabla XV: Frecuencia de sueros con absorbancias superiores o inferiores a la media según el tamaño de la explotación. \* G: granjas con más de 100 animales; M: granjas entre 20 y 100 animales; P: granjas con menos de 20 animales.

Confirmada la existencia de diferencias entre los niveles de absorbancia para cada tipo de explotación, se ha estratificado la muestra en relación a la época del año en la que se recogieron los sueros para comprobar si existe alguna interacción. Los resultados se han representado gráficamente en la figura 15, y aparecen detallados en las tablas XVI, XVII, XVIII y XIX.

Durante el primer trimestre, los sueros con niveles de absorbancia más altos pertenecen a explotaciones grandes y el porcentaje va disminuyendo con el tamaño, aunque en todos los tipos de granja se puede observar que la mayoría de sueros tienen valores ELISA superiores a 0,72.

En el segundo trimestre existen diferencias significativas, ya que también las granjas grandes tienen mayores niveles de absorbancia que el resto, pero en cambio se ha comprobado que la mayoría de los sueros tienen valores ELISA por debajo de la media.

La tendencia en el tercer trimestre es similar a lo observado en el primero, es decir, más del 50% de los sueros tienen absorbancias superiores a la media, y además los sueros de las explotaciones grandes tienen niveles de absorbancia más altos que los recogidos en las medianas y pequeñas.

En el cuarto trimestre, las absorbancias son superiores a la media en todas las explotaciones y no se observan diferencias significativas entre ellas.

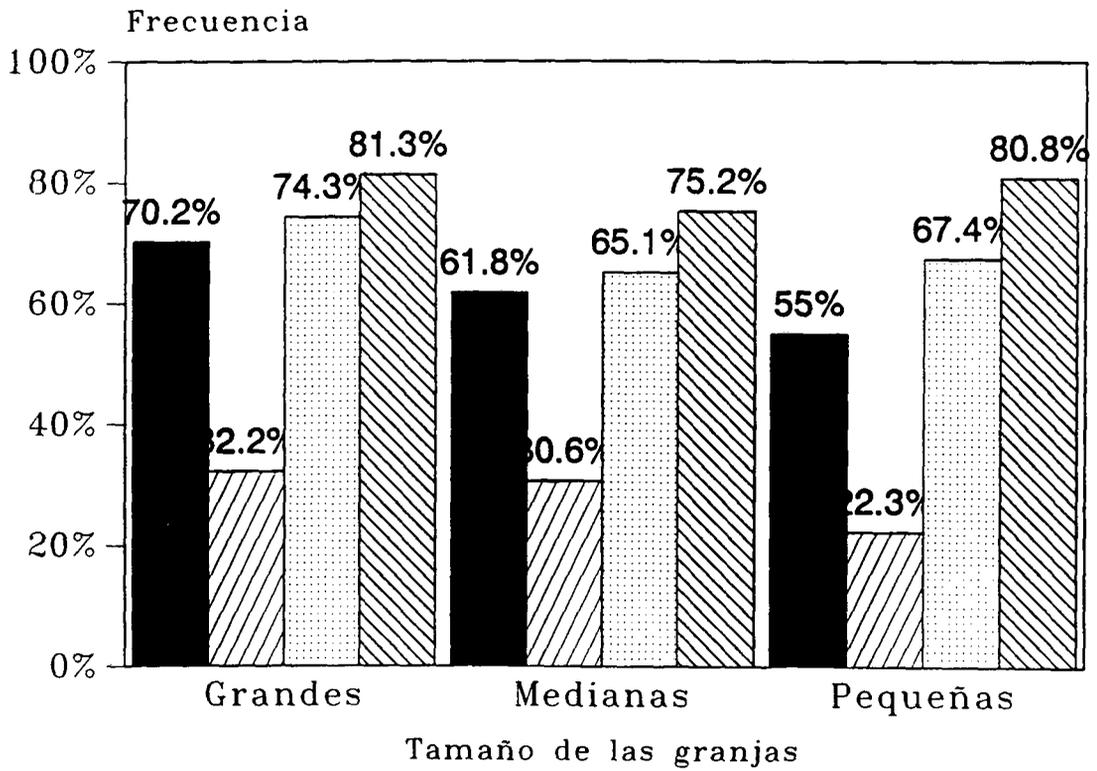
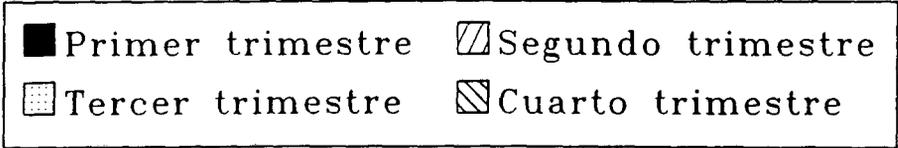


Figura 15: Frecuencia de sueros con absorbancias superiores a la media, para cada época del año y según el tipo de explotación.

	> 0,72	< 0,72
G*	92 (70,2%)	39 (29,8%)
M	136 (61,8%)	84 (38,2%)
P	111 (55,0%)	91 (45,0%)

$$\chi^2 = 7,86 \quad p < 0,05$$

Tabla XVI: Frecuencia de sueros con absorbancias superiores o inferiores a la media durante el **primer trimestre**. \* G: granjas con más de 100 animales; M: granjas entre 20 y 100 animales; P: granjas con menos de 20 animales.

	> 0,72	< 0,72
G	163 (32,2%)	343 (67,8%)
M	187 (30,6%)	425 (69,4%)
P	40 (22,3%)	139 (77,7%)

$$\chi^2 = 6,25 \quad p < 0,05$$

Tabla XVII: Frecuencia de sueros con absorbancias superiores o inferiores a la media durante el **segundo trimestre**.

	> 0,72	< 0,72
G	197 (74,3%)	68 (25,7%)
M	293 (65,1%)	157 (34,9%)
P	58 (67,4%)	28 (32,6%)

$$\chi^2 = 6,62 \quad p < 0,05$$

Tabla XVIII: Frecuencia de sueros con absorbancias superiores o inferiores a la media durante el **tercer trimestre**.

	> 0,72	< 0,72
G	279 (81,3%)	64 (18,7%)
M	173 (75,2%)	57 (24,8%)
P	143 (80,8%)	34 (19,2%)

$$\chi^2 = 3,45 \quad p = 0,178 \text{ (n.s.)}$$

Tabla XIX: Frecuencia de sueros con absorbancias superiores o inferiores a la media durante el **cuarto trimestre**.

#### 4.2.3. RESULTADOS SEGÚN LA PROVINCIA DE ORIGEN

##### A) Prevalencia de las infecciones por CVRP/VGET

Se han observado diferencias en la prevalencia según la provincia de origen, siendo la más alta para los sueros procedentes de Tarragona y la más baja para los sueros recogidos en Girona (tabla XX, figura 16).

	POSITIVOS	NEGATIVOS
Girona	723 (88,3%)	96 (11,7%)
Lleida	1351 (92,8%)	105 (7,2%)
Tarragona	210 (95,5%)	10 (4,5%)
Barcelona	1117 (90,2%)	122 (9,8%)

$$\chi^2 = 19,64 \quad p < 0,001$$

Tabla XX: Resultados al ELISA de inmunocaptura para los sueros según su provincia de origen.

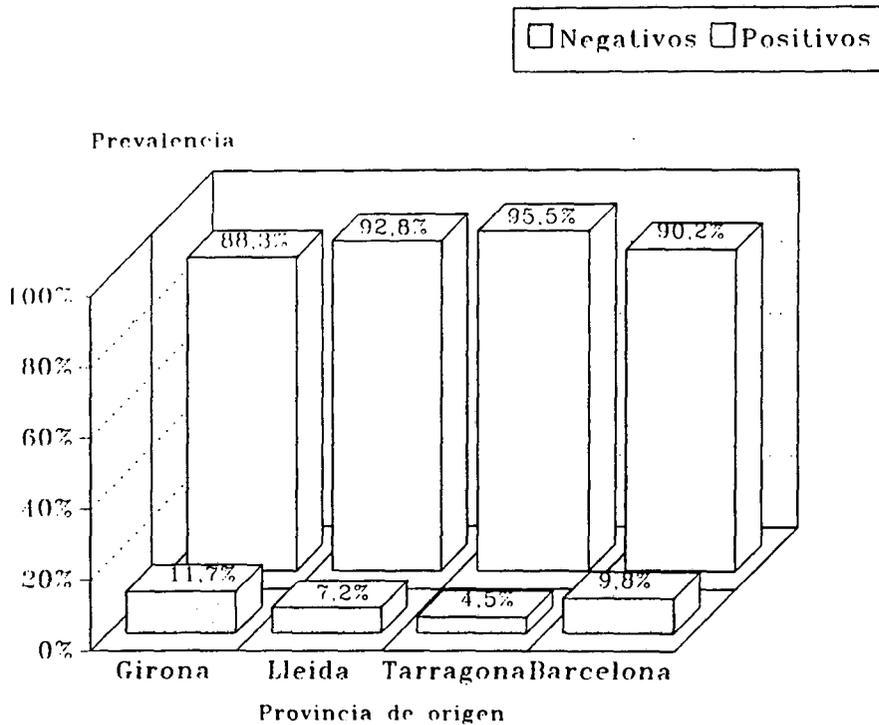


Figura 16: Prevalencia según la provincia de origen.

Los valores de R.R. y O.R. con sus valores de  $\chi^2$  correspondientes a cada provincia están indicados en la tabla XXI. Se ha observado una asociación estadísticamente significativa entre los sueros procedentes de Girona, Lleida y Tarragona y la aparición de anticuerpos al CVRP/VGET.

	R.R.	O.R.	$\chi^2$
Girona	0,96 (0,94-0,99)	0,67 (0,51-0,87)	9,71 p<0,001
Lleida	1,03 (1,01-1,05)	1,43 (1,11-1,84)	8,22 p<0,01
Tarragona	1,05 (1,02-1,08)	2,13 (1,08-4,33)	4,95 p<0,05
Barcelona	0,98 (0,96-1,01)	0,85 (0,66-1,08)	1,80 p= (n.s.)

Tabla XXI: Valores de R.R. y O.R., y sus intervalos correspondientes para un 95% de confianza, para cada provincia de origen y la presentación de sueros positivos.

### B) Absorbancias de los sueros positivos

El análisis de la varianza muestra diferencias altamente significativas en las absorbancias de los sueros de las cuatro provincias (tabla XXII, figura 17). Tarragona es la provincia con mayores niveles de absorbancia de media y la que muestra menor desviación estándar, mientras que Barcelona es la que tiene la media más baja:

	Media	Desviación estándar
Girona	0,67	0,278
Lleida	0,78	0,274
Tarragona	0,84	0,200
Barcelona	0,63	0,277

$$H = 242,233 \quad p < 0,001$$

Tabla XXII: Cálculo de la media y la desviación estándar para las absorbancias de los sueros positivos según la provincia de origen.

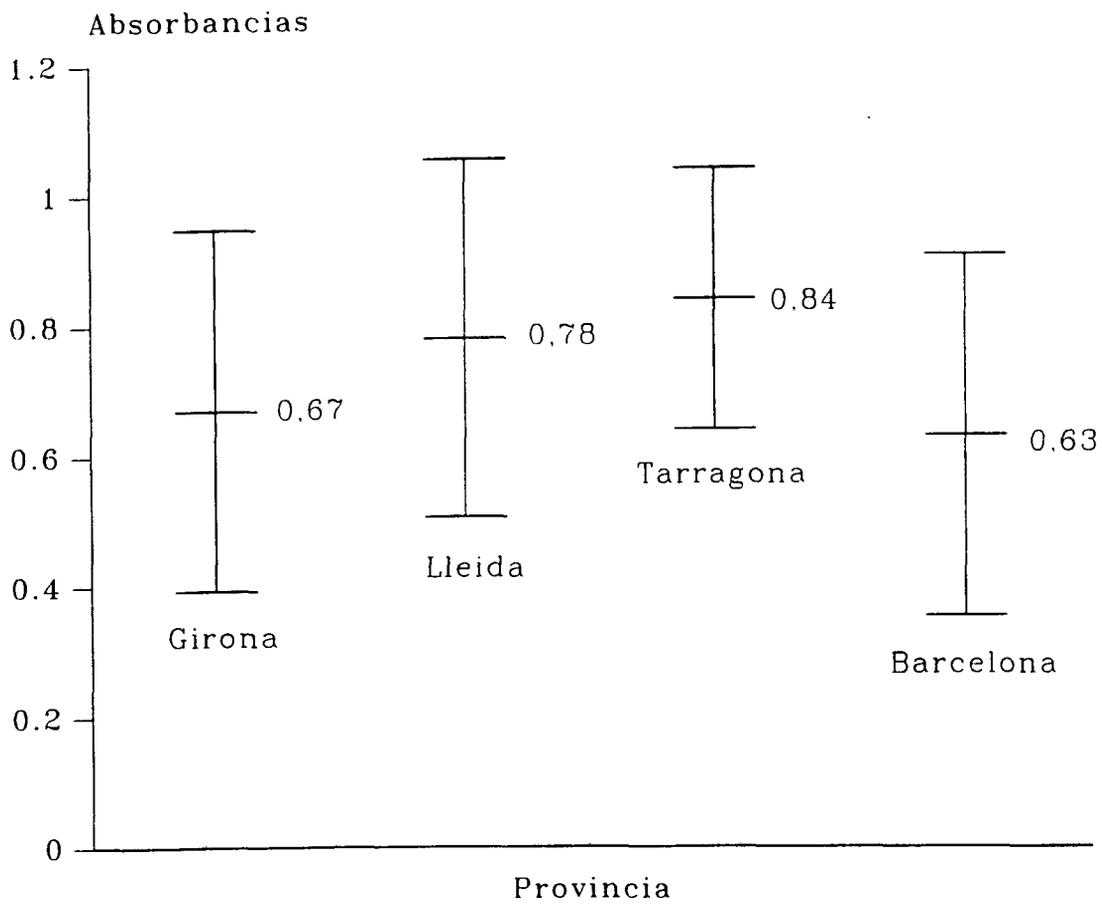


Figura 17: Absorbancia media estándar de los sueros para cada provincia y desviación.

La distribución de sueros positivos según la absorbancia media también refleja esas diferencias para la provincia de origen. En este caso, se comprueba que Tarragona y Lleida tienen un mayor porcentaje de sueros con absorbancias superiores a la media, mientras que Girona y Barcelona tienen más del 50% de sueros con absorbancias inferiores a la media (Tabla XXIII).

	> 0,72	< 0,72
Girona	354 (49,0%)	369 (51,0%)
Lleida	892 (66,0%)	459 (34,0%)
Tarragona	169 (80,5%)	41 (19,5%)
Barcelona	457 (40,9%)	660 (59,1%)

$$\chi^2 = 221,66 \quad p < 0,001$$

Tabla XXIII: Frecuencia de sueros con absorbancias superiores o inferiores a la media según la provincia de origen.

Las muestras positivas difieren en su nivel de absorbancia para cada provincia de origen, excepto entre Lleida y Tarragona, tal como se comprueba al comparar los diferentes niveles de absorbancia de las cuatro provincias entre sí (Tabla XXIV).

	Girona	Lleida	Tarragona	Barcelona
Girona	-	92,5 <sup>1</sup>	71,911 <sup>1</sup>	6,49 <sup>2</sup>
Lleida	-	-	0,907 <sup>3</sup>	174,857 <sup>1</sup>
Tarragona	-	-	-	93,770 <sup>1</sup>
Barcelona	-	-	-	-

Tabla XXIV: Valores de la H de Kruskal-Wallis para las diferencias en las absorbancias de los sueros positivos según la provincia de origen. <sup>1</sup> p<0,001; <sup>2</sup> p<0,5; <sup>3</sup> n.s.

#### 4.2.4. RESULTADOS SEGÚN LA COMARCA DE ORIGEN

##### A) Prevalencia de las infecciones por CVRP/VGET

El total de sueros examinados en cada comarca y el porcentaje correspondiente a los positivos y negativos a la infección por el CVRP/VGET se detalla en la tabla XXV.

COMARCA	Pos. (%)	Neg. (%)	Total
ALT CAMP	65 (100,0)	0 (0,0)	65
ALT EMPORDA	166 (89,7)	19 (10,3)	185
ALT URGELL	5 (33,3)	10 (66,7)	15
ANOIA	86 (87,8)	12 (12,2)	98
BAGES	198 (95,2)	10 (4,8)	208
BAIX CAMP	113 (94,2)	7 (5,8)	120
BAIX EMPORDA	189 (85,5)	32 (14,5)	221
BERGUEDA	84 (71,8)	33 (28,2)	117
GARRIGUES	66 (91,7)	6 (8,3)	72
GARROTXA	77 (83,7)	15 (16,3)	92
GIRONES	98 (94,2)	6 (5,8)	104
LA SELVA	111 (84,7)	20 (15,3)	131
NOGUERA	409 (92,5)	33 (7,5)	442
OSONA	503 (93,0)	38 (7,0)	541
PALLARS - JUSSA	13 (81,3)	3 (18,8)	16
PLA D'URGELL	131 (97,0)	4 (3,0)	135
PLA DE L'ESTANY	82 (95,3)	4 (4,7)	86
RIBERA D'EBRE	32 (91,4)	3 (8,6)	35
SEGARRA	104 (91,2)	10 (8,8)	114
SEGRIA	365 (97,1)	11 (2,9)	376
SOLSONES	102 (84,3)	19 (15,7)	121
URGELL	156 (94,5)	9 (5,5)	165
VALLES OCCIDENTAL	118 (87,4)	17 (12,6)	135
VALLES ORIENTAL	128 (91,4)	12 (8,6)	140
<b>Total</b>	<b>333</b>	<b>3.401</b>	<b>3.734</b>

$$\chi^2 = 195,31 \quad p < 0,001$$

Tabla XXIV: Resultados al ELISA de inmunocaptura según la comarca de origen.

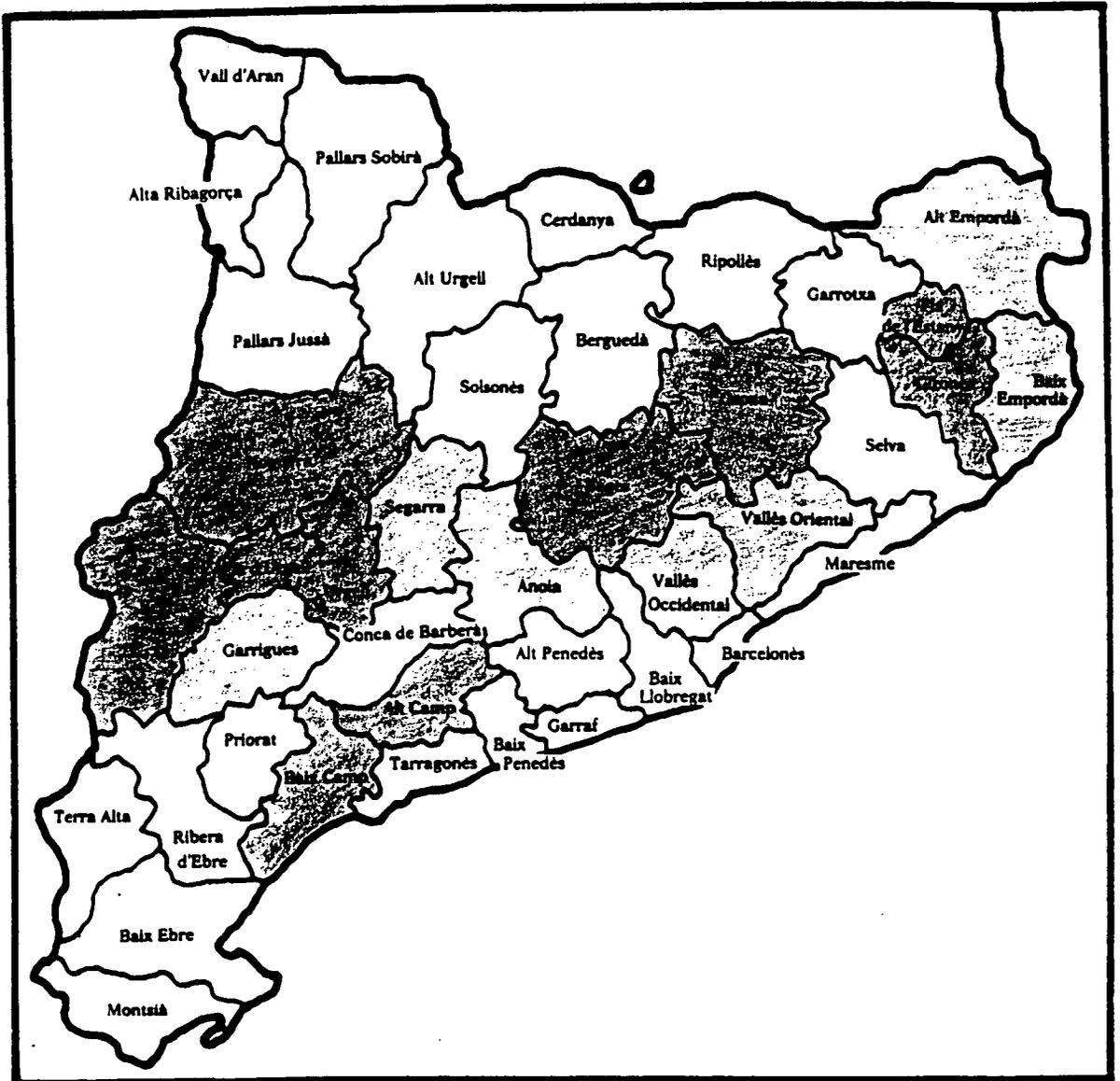
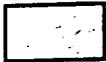


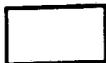
Figura 18: Agrupación de comarcas según la prevalencia al CVRP/VGET.



A: Prevalencia superior al 92%



B: Prevalencia entre el 85 y el 92%



C: Prevalencia inferior al 85%

Se han agrupado las comarcas de forma arbitraria en tres grupos (A, B y C) en relación a su nivel de prevalencia, tal como se representa en la figura 18:

En el grupo A se han incluido las comarcas con las prevalencias más altas, superiores al 92%: Alt Camp, Bages, Baix Camp, Gironès, Noguera, Osona, Pla d'Urgell, Pla de l'Estany, Segrià y Urgell.

En el grupo B están las comarcas del Alt Empordà, Anoia, Baix Empordà, Garrigues, Segarra, Vallès Occidental y Vallès Oriental, con prevalencias entre el 85 y el 92%

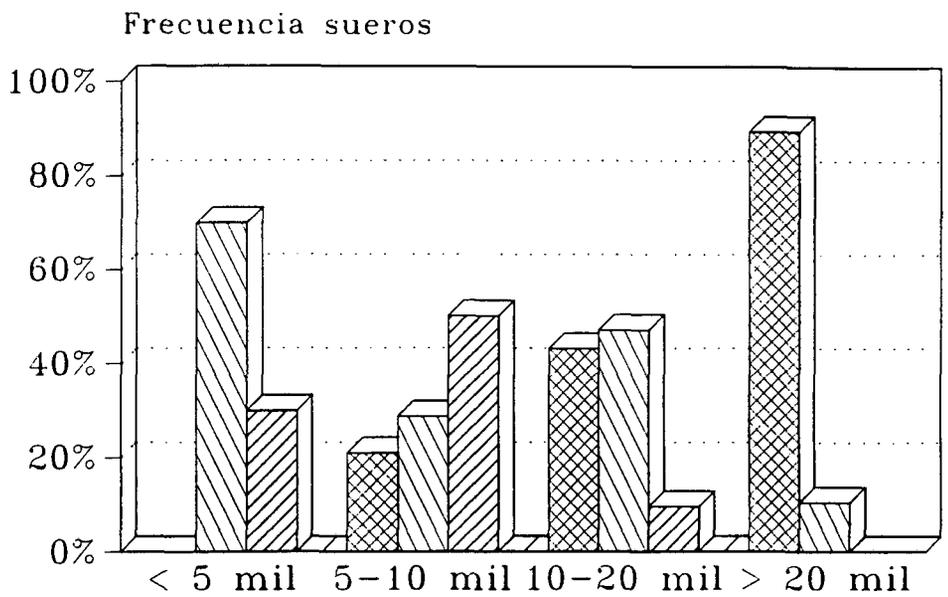
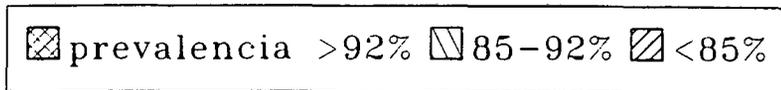
Por último, al grupo C se han asignado las comarcas restantes, con prevalencias inferiores al 85%: Alt Urgell, Berguedà, Garrotxa, La Selva, Pallars-Jussà y Solsonès.

Estos tres grupos se han comparado en una tabla de contingencia con los cuatro grupos de comarcas (1, 2, 3 y 4) del censo de reproductoras (ver figura 3, en material y métodos), observando que las comarcas con mayor número de reproductoras (tipo 4) también tienen prevalencias más altas (grupo A). El número y porcentaje de sueros correspondientes a cada grupo de comarcas están reflejados en la tabla XXVI y en la figura 19.

	A (>92%)	B (85%-92%)	C (<85%)
< 5 mil	0	35 (70,0)	15 (30,0)
5 - 10 mil	151 (21,0)	207 (28,8)	360 (50,1)
10 - 20 mil	524 (43,1)	573 (47,2)	117 (9,6)
> 20 mil	1.567 (89,5)	185 (10,5)	0

$$\chi^2 = 1916,57 \quad p < 0,001$$

Tabla XXVI: Número y porcentaje de sueros en cada grupo de comarcas según el censo y según el nivel de prevalencia al ELISA de inmunocaptura.



prevalencia >92%		21%	43.2%	89.5%
85-92%	70%	28.8%	47.2%	10.5%
<85%	30%	50.2%	9.6%	

Grupos de comarcas según censo

Figura 19: Frecuencia de sueros según grupos de comarcas según censo.

## B) Absorbancias de los positivos

Manteniendo los grupos de comarcas según el censo de reproductoras del punto anterior, se han observado diferencias significativas en relación a las absorbancias de los sueros positivos mediante el análisis de la varianza (tabla XXVII, figura 20). La media más baja corresponde a las comarcas con un censo entre 5 y 10 mil reproductoras, aunque también son las que presentan variaciones a la media más importantes. En la figura 20 se puede ver que los niveles de absorbancia máximos para este grupo de comarcas están próximos a los de las comarcas con censo superior y medias más altas.

	Media	Desviación estándar
< 5 mil	0,791	0,246
5 - 10 mil	0,652	0,313
10 - 20 mil	0,730	0,273
> 20 mil	0,723	0,271

$H = 30,824 \quad p < 0,001$

Tabla XXVII: Análisis de la varianza para las absorbancias de los sueros positivos para cada grupo comarcal según el censo.

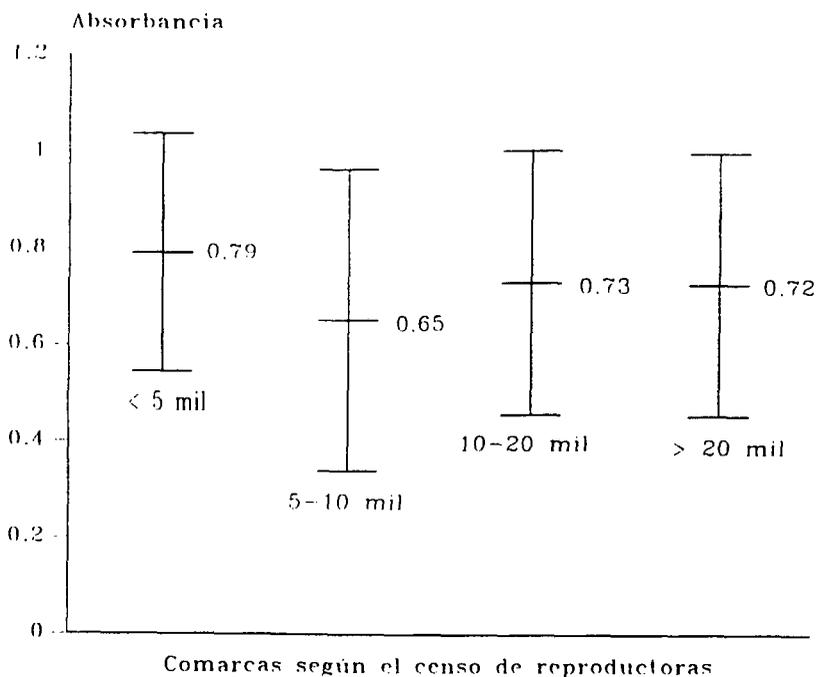


Figura 20: Absorbancia media de los sueros para cada comarca según el censo de reproductoras.

#### 4.2.5. RESULTADOS SEGÚN LA ÉPOCA DEL AÑO

##### A) Prevalencia de las infecciones por el CVRP/VGET

Todas las muestras para el estudio epidemiológico se recogieron a lo largo del año 1991 y para facilitar el estudio estadístico se agruparon en cuatro trimestres, coincidentes en buena parte con las estaciones del año.

En el cálculo de la prevalencia en las diferentes épocas consideradas se observaron diferencias significativas, con un incremento paulatino del porcentaje de positivos en los tres primeros trimestres (tabla XXVIII y figura 21).

	POSITIVOS	NEGATIVOS
1 <sup>er</sup> trimestre	553 (87,6%)	78 (12,4%)
2 <sup>o</sup> trimestre	1297 (90,0%)	144 (10,0%)
3 <sup>er</sup> trimestre	801 (93,57%)	56 (6,5%)
4 <sup>o</sup> trimestre	750 (93,2%)	55 (6,8%)

$$\chi^2 = 21,57 \quad p < 0,001$$

Tabla XXVIII: Resultados al ELISA de inmunocaptura para los sueros según la época del año.

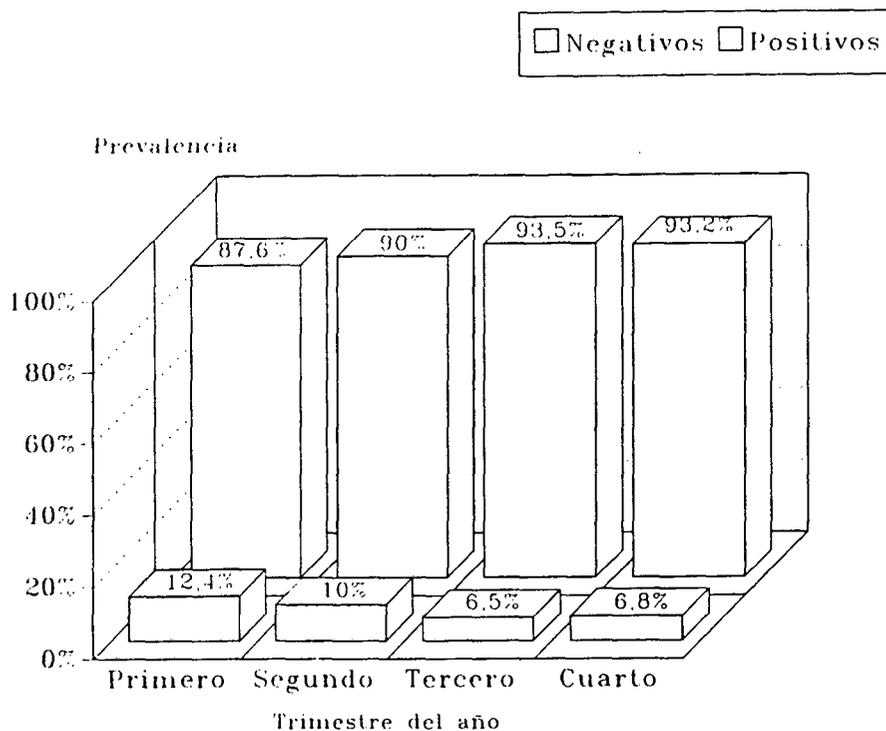


Figura 21: Prevalencia según el trimestre del año.

Para cada tipo de explotación según el tamaño se calculó la prevalencia en cada trimestre y los resultados totales se presentan en la figura 22. El análisis estratificado de los resultados de los sueros según el tamaño de la granja aparece en las tablas XXIX, XXX y XXXI.

	POSITIVOS	NEGATIVOS
1 <sup>er</sup> trimestre	202 (74,8%)	68 (25,2%)
2 <sup>o</sup> trimestre	179 (78,5%)	49 (21,5%)
3 <sup>er</sup> trimestre	86 (82,7%)	18 (17,3%)
4 <sup>o</sup> trimestre	177 (88,5%)	23 (11,5%)

$$\chi^2 = 14,47 \quad p < 0,01$$

Tabla XXIX: Resultados al ELISA de inmunocaptura para los sueros según el periodo del año para los sueros pertenecientes a granjas pequeñas.

	POSITIVOS	NEGATIVOS
1 <sup>er</sup> trimestre	220 (96,5%)	8 (3,5%)
2 <sup>o</sup> trimestre	612 (88,1%)	83 (11,9%)
3 <sup>er</sup> trimestre	450 (93,8%)	30 (6,2%)
4 <sup>o</sup> trimestre	230 (90,9%)	23 (9,1%)

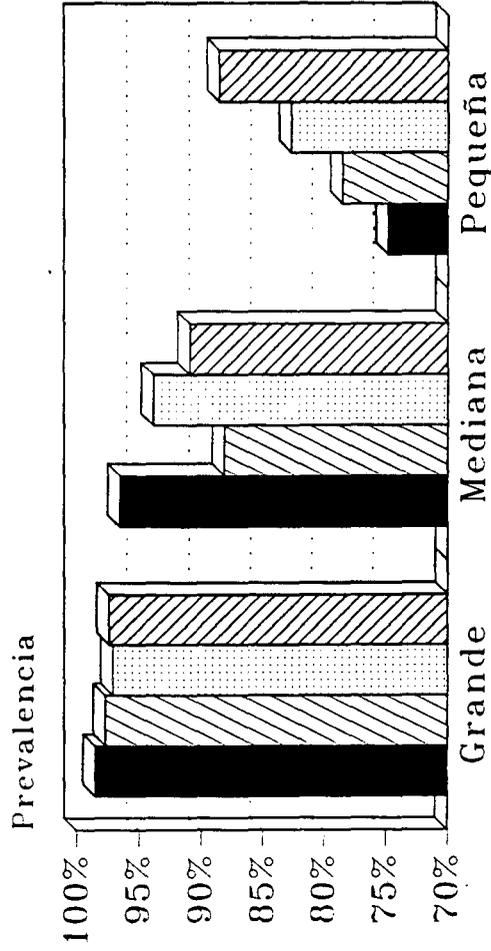
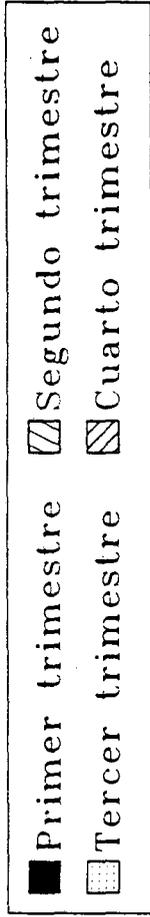
$$\chi^2 = 20,62 \quad p < 0,001$$

Tabla XXX: Resultados al ELISA de inmunocaptura para los sueros según el trimestre del año para los sueros pertenecientes a granjas medianas.

	POSITIVOS	NEGATIVOS
1 <sup>er</sup> trimestre	131 (98,5%)	2 (2,5%)
2 <sup>o</sup> trimestre	506 (97,7%)	12 (2,3%)
3 <sup>er</sup> trimestre	265 (97,1%)	8 (2,9%)
4 <sup>o</sup> trimestre	343 (97,4%)	9 (2,6%)

$$\chi^2 = 0,82 \quad p = 0,85 \text{ (n.s.)}$$

Tabla XXXI: Resultados al ELISA de inmunocaptura para los sueros según el trimestre del año para los sueros pertenecientes a granjas grandes.



Tipo de explotación	Primer trimestre	Segundo trimestre	Tercer trimestre	Cuarto trimestre
Grande	98.5%	97.7%	97.1%	97.4%
Mediana	96.5%	88.1%	93.8%	90.9%
Pequeña	74.8%	78.5%	82.7%	88.5%

Tipo de explotación

Figura 22: Prevalencia según el tipo de explotación.

En las granjas pequeñas la proporción de positivos avanza con el tiempo con diferencias estadísticamente significativas. Para las granjas medianas también hay diferencias significativas entre los distintos periodos. Es destacable una menor prevalencia durante el segundo trimestre en los sueros de este tipo de granjas. En cambio, no hay diferencias apreciables para la prevalencia en las granjas de más de 100 reproductoras, en todo el año la proporción de sueros positivos al ELISA de inmunocaptura es muy alta y similar.

Se ha comprobado una mayor asociación entre los sueros recogidos en el tercer o en el cuarto trimestre y la presentación de positivos, mientras que el primer trimestre parece ser un factor protector a la aparición de positivos respecto a las demás épocas (tabla XXXII):

	R.R.	O.R.	$\chi^2$
1 <sup>er</sup> trimestre	0,95 (0,93-0,99)	0,63 (0,48-0,84)	10,58 p<0,001
2 <sup>o</sup> trimestre	0,98 (0,96-1,00)	0,81 (0,64-1,02)	3,13 p=0,08 (n.s.)
3 <sup>er</sup> trimestre	1,03 (1,01-1,06)	1,51 (1,12-2,08)	7,40 p<0,01
4 <sup>o</sup> trimestre	1,03 (1,01-1,05)	1,43 (1,05-1,96)	5,17 p<0,05

Tabla XXXII: Valores de R.R. y O.R., y sus intervalos correspondientes para un 95% de confianza, para cada trimestre del año y la presentación de sueros positivos.

### B) Absorbancias de los positivos

El análisis de la varianza nos muestra que los niveles de absorbancia no son homogéneos para las cuatro épocas del año, con valores sensiblemente inferiores a la media en los sueros recogidos en primavera (tabla XXXIII, figura 23).

	Media	Desviación estándar
1 <sup>er</sup> trimestre	0,74	0,244
2 <sup>o</sup> trimestre	0,57	0,268
3 <sup>er</sup> trimestre	0,80	0,279
4 <sup>o</sup> trimestre	0,84	0,222

H = 556,79 p<0,001

Tabla XXXIII: Análisis de la varianza para las absorbancias de los sueros positivos según la época del año.

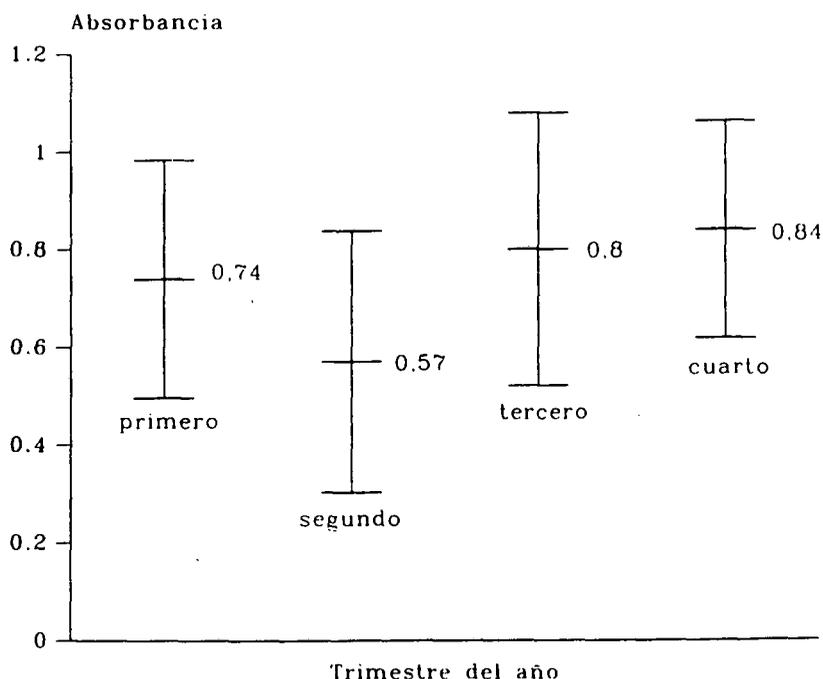


Figura 23: Absorbancia media de los sueros para cada época del año.

Los porcentajes de sueros positivos con absorbancias superiores o inferiores a la media en relación a la época del año también reflejan estas diferencias.

Hemos observado diferencias significativas en los valores de absorbancia para cada estación del año respecto a todas las demás, excepto para el verano y el otoño (tabla XXXIV). En estos dos periodos los valores ELISA son más altos, lo que coincide con los mayores niveles de prevalencia encontrados en estas dos épocas.

	1 <sup>er</sup> trimestre	2 <sup>o</sup> trimestre	3 <sup>er</sup> trimestre	4 <sup>o</sup> trimestre
1 <sup>er</sup> trimestre	-	173,328 <sup>1</sup>	31,110 <sup>1</sup>	70,279 <sup>1</sup>
2 <sup>o</sup> trimestre	-	-	312,795 <sup>1</sup>	461,98 <sup>1</sup>
3 <sup>er</sup> trimestre	-	-	-	3,624 <sup>2</sup>
4 <sup>o</sup> trimestre	-	-	-	-

Tabla XXXIV: Valores de la H de Kruskal-Wallis para las diferencias en las absorbancias de los sueros positivos según la época del año. <sup>1</sup> p<0,001; <sup>2</sup> n.s.

### 4.3. RESULTADOS AL ELISA DE INMUNOCAPTURA EN EXPLOTACIONES DE REPRODUCTORAS

#### 4.3.1. PREVALENCIA DE INFECCIÓN POR EL CVRP/VGET

En las 569 granjas estudiadas, 550 presentaron algún suero positivo (96,7%) y sólo 19 estaban libres de anticuerpos en las muestras analizadas (figura 24). La extrapolación de estos datos a la población total de granjas de reproductoras, según el censo que hemos considerado (10.708 explotaciones), permite una precisión del 1,4%, es decir, que la población estudiada presenta una prevalencia de infección por el VGET/CVRP entre 96,3% y 98,1% de las granjas.

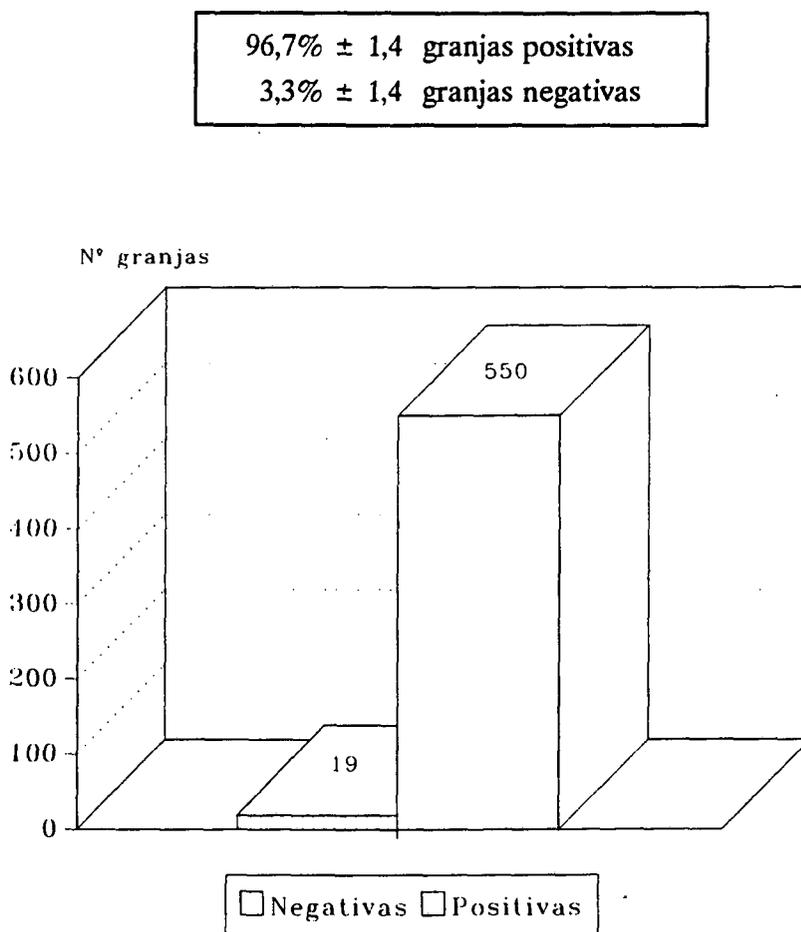


Figura 24: Resultados para el total de granjas en el ELISA de inmunocaptura.

#### 4.3.2. RESULTADOS SEGÚN EL TAMAÑO DE LAS GRANJAS

Al estudiar la prevalencia de granjas infectadas en relación al tipo de explotación se ha observado que a medida que aumenta el tamaño de la granja también aumenta la prevalencia de infección por alguno o por ambos coronavirus estudiados (tabla XXXV, figura 25).

	POSITIVAS	NEGATIVAS
G*	164 (100%)	0
M	219 (98,2%)	4 (1,8%)
P	167 (91,8%)	15 (8,2%)

$\chi^2 = 20,87 \quad p < 0,001$

Tabla XXXV: Granjas positivas y negativas al ELISA de inmunocaptura según el tamaño de la explotación. \* G: granjas con más de 100 animales; M: granjas entre 20 y 100 animales; P: granjas con menos de 20 animales.

En relación al censo de granjas que hemos considerado, la precisión de estos valores de prevalencia se ha calculado en 3,2 y 3,9 para las explotaciones de tipo mediano y pequeño respectivamente. Esto supone que todas las granjas grandes (1.204), entre 4.340 y 4.632 de las de tamaño mediano y entre 4.339 y 4.724 de las de menos de 20 reproductoras, tienen al menos un animal con anticuerpos frente al CVRP/VGET (tabla XXXVI).

	Nº granjas	Prevalencia	Precisión
G*	1.204	100,0%	-
M	4.568	98,2%	± 3,2
P	4.936	91,8%	± 3,9

Tabla XXXV: Precisión estimada para la prevalencia en las granjas de la población estudiada, según el tamaño de la explotación. \* G: granjas con más de 100 animales; M: granjas entre 20 y 100 animales; P: granjas con menos de 20 animales.

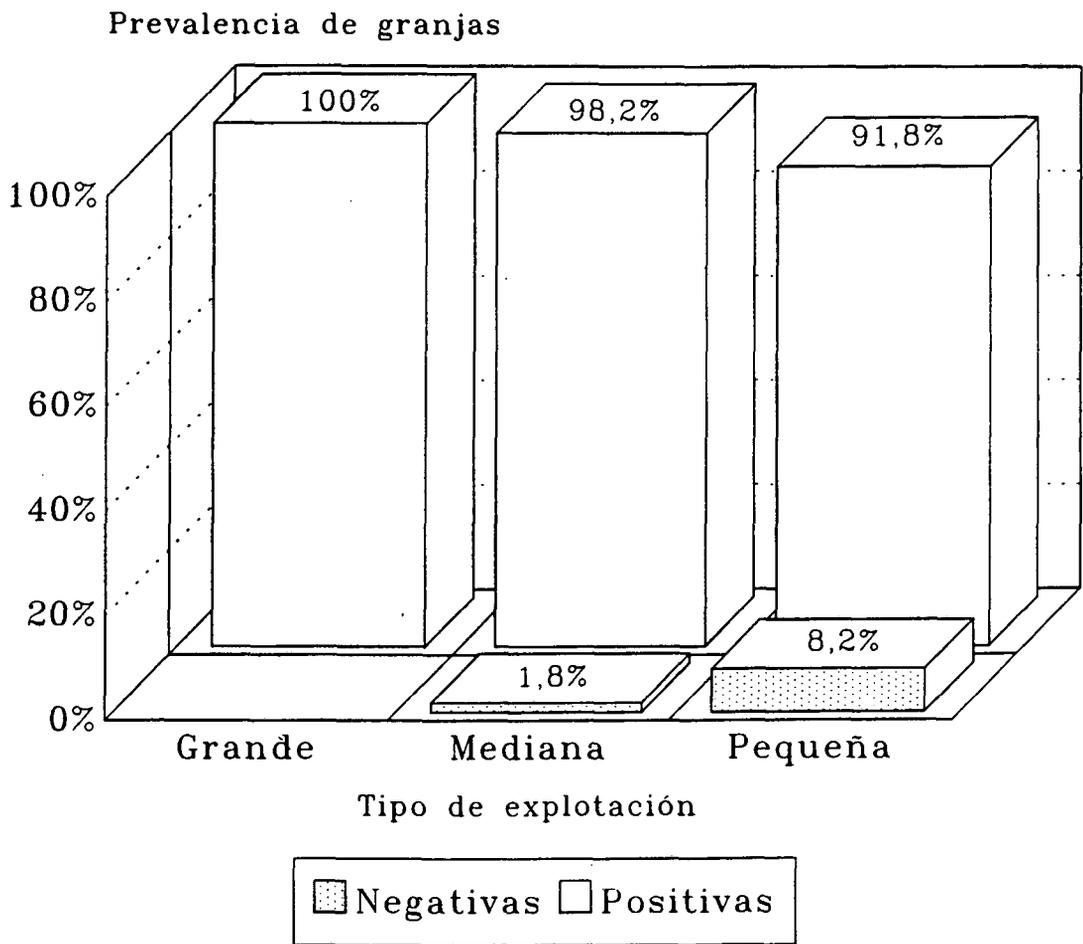


Figura 25: Prevalencia de infección en las granjas según el tipo de explotación.

#### 4.3.3. RESULTADOS SEGÚN EL ORIGEN DE LAS EXPLOTACIONES

La alta prevalencia de infección por el VGET/CVRP en las granjas no permite calcular la  $\chi^2$  para detectar las posibles diferencias según las comarcas de origen. Por eso, hemos agrupado las comarcas en cuatro categorías según el censo de reproductoras para hacer posible este cálculo.

No se han observado diferencias significativas entre las granjas estudiadas atendiendo al tipo de comarca ni tampoco a su provincia de origen.

#### 4.3.4. RESULTADOS SEGÚN LA ÉPOCA DEL AÑO

El pequeño tamaño de la muestra de granjas negativas no permite calcular la chi cuadrado para los cuatro periodos considerados. Se han agrupado las granjas estudiadas en el primer semestre del año y las estudiadas durante el segundo semestre sin observar diferencias significativas en la presentación de granjas positivas.

#### **4.4. RESULTADOS POR ELISA DIFERENCIAL**

##### **4.4.1. RESULTADOS AL ELISA DIFERENCIAL EN SUEROS DE REPRODUCTORAS**

De cada una de las 550 granjas positivas al ELISA de inmunocaptura se tomaron dos sueros positivos para el análisis por ELISA diferencial, lo que representó una muestra de 1.100 sueros. Se clasificaron como positivos al VGET si el porcentaje de competición con el anticuerpo monoclonal específico (1DB12) fue superior al 55%, y como positivos al CVRP cuando la competición fue inferior a ese valor, tal como se ha descrito en el apartado 3.3.3.

Para las explotaciones en las que se obtuvieron resultados distintos en los dos sueros se estudiaron el total de muestras recogidas en esas granjas, lo que representaron 533 sueros más. Del total de 1.633 sueros analizados por ELISA diferencial los resultados fueron:

<b>403</b>	<b>(24,7%)</b>	<b>sueros positivos al VGET</b>
<b>1.230</b>	<b>(75,3%)</b>	<b>sueros positivos al CVRP</b>

Este resultado no excluye la posibilidad de que los sueros positivos al VGET también tuvieran anticuerpos debidos a la infección por el CVRP, pero hasta la fecha no se dispone de ningún método para poder detectar y diferenciar los dos tipos de anticuerpos. Además, entre los sueros positivos sólo al CVRP pueden haber falsos negativos al VGET, ya que la competición con el monoclonal puede haber sido inferior al 55%

Estos resultados no pueden extrapolarse a la población de reproductores ya que los sueros no se obtuvieron al azar y la muestra no es totalmente representativa.

#### 4.4.2. RESULTADOS AL ELISA DIFERENCIAL EN EXPLOTACIONES

Se han reunido las 569 explotaciones estudiadas en cuatro grupos de acuerdo a los resultados obtenidos (tabla XXXVI, figura 26), considerando que la detección de un suero positivo al CVRP o al VGET era indicativo de que la granja estaba infectada por el virus correspondiente.

	Nº granjas	Prevalencia
<b>Negativas</b>	19	3,3%
<b>Positivas</b>	550	96,7%
CVRP	371	65,2%
VGET	49	8,6%
CVRP+VGET	130	22,8%

Tabla XXXVI: Resultados para el total de las granjas estudiadas.

En el primer grupo están todas las granjas negativas, es decir, aquellas explotaciones donde todos los sueros estudiados por ELISA de inmunocaptura dieron absorbancias inferiores a 0.100. Estos sueros no se analizaron por ELISA diferencial aunque se tuvieron en cuenta para el cálculo de las prevalencias.

El otro grupo se incluyen las granjas positivas sólo al CVRP, si los dos sueros estudiados por ELISA diferencial dieron este resultado.

Otro grupo es el de las granjas consideradas positivas sólo al VGET, con el mismo criterio que en el caso anterior.

Y por último, se han sumado todas las granjas con sueros positivos a ambos virus. Sólo en este caso, se analizaron por ELISA diferencial el resto de los sueros obtenidos en cada explotación que además habían resultado positivos al CVRP/VGET por ELISA de inmunocaptura.

El nivel de precisión calculado para los resultados de las granjas negativas es del 1,4, lo que significa que en la población de granjas estudiadas sean negativas entre 203 y 503 del total. En el caso de las positivas se han sumado las granjas con infección por los

### Prevalencia de granjas

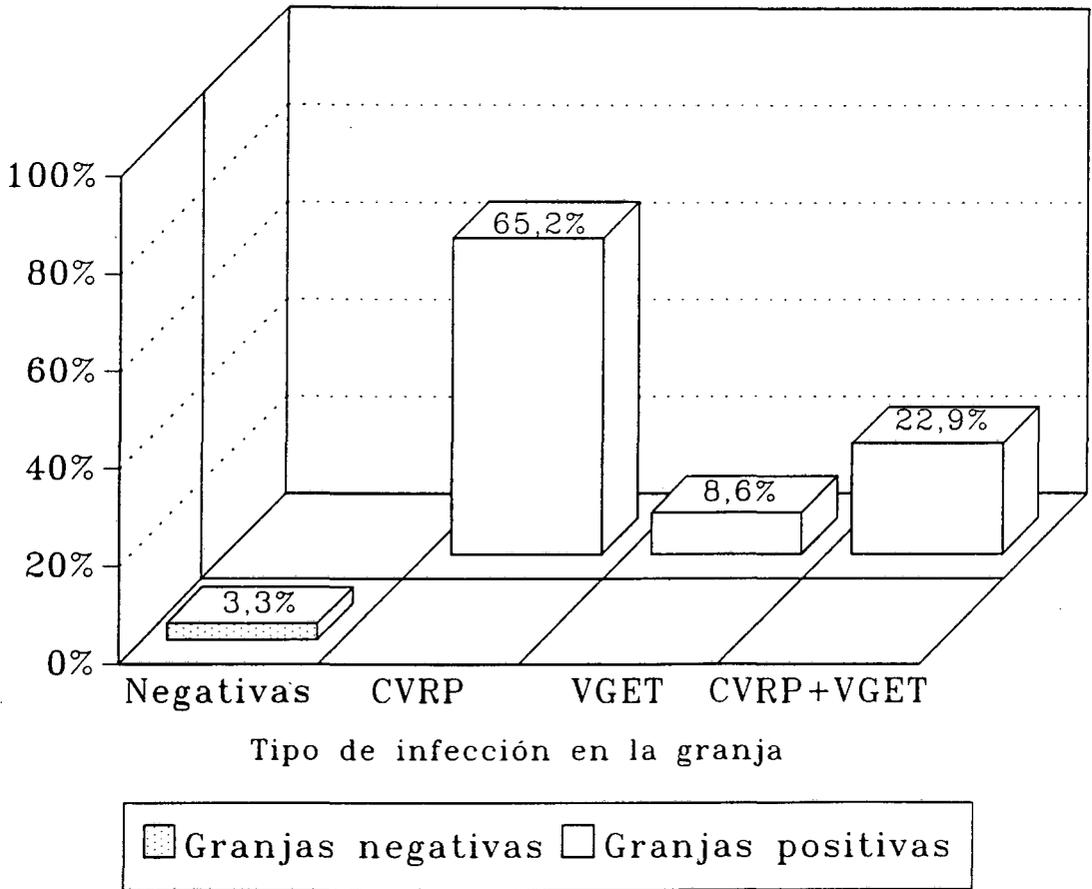


Figura 26: Resultados para el total de granjas estudiadas.

dos coronavirus a cada uno de los otros dos grupos, de manera que la prevalencia de infección por el CVRP es como mínimo de  $88,0\% \pm 2,6$  (entre 9.133 y 9.691 granjas) y para el VGET es de  $31,5\% \pm 3,7$  (entre 2.955 y 3.748 granjas).

**$31,5\% \pm 3,7$  granjas positivas al VGET**  
 **$88,0\% \pm 2,6$  granjas positivas al CVRP**  
 **$3,3\% \pm 1,4$  granjas negativas**

#### 4.4.2.1. Prevalencia de las granjas según el tamaño de la explotación

La prevalencia de infección se ha calculado para cada posible estado de infección y según el tamaño de la granja. Los resultados se muestran en la tabla XXXVII.

	PRCV	VGET	PRCV+VGET	NEGATIVOS
G*	105 (64%)	19 (11,6%)	40 (24,4%)	0
M	147 (65,9%)	18 (8,1%)	54 (24,2%)	4 (1,8%)
P	119 (65,4%)	12 (6,6%)	36 (19,8%)	15 (8,2%)

Tabla XXXVII: Prevalencia de cada infección según el tamaño de la granja. \* G: granjas con más de 100 animales; M: granjas entre 20 y 100 animales; P: granjas con menos de 20 animales.

No se han demostrado diferencias estadísticamente significativas entre las granjas positivas por ELISA de inmunocaptura comparando las que tienen algún suero positivo al VGET frente a las demás.

#### 4.4.2.2. Asociación entre el tamaño de la granja y la infección por el CVRP o el VGET.

##### **- Infección por el VGET.**

Se han tenido en cuenta todas las granjas con algún suero positivo al VGET, con independencia de otros resultados, no observándose ninguna relación entre el tamaño de la granja y la aparición o no de anticuerpos específicos.

**- Infección por el CVRP.**

Al comparar las granjas sólo con sueros positivos al CVRP frente a las infectadas por VGET no se ha comprobado una asociación estadística entre este tipo de granjas y la ausencia de anticuerpos anti-VGET.

**4.4.2.3. Cálculo de la prevalencia dentro de las granjas.**

Los resultados de los sueros obtenidos en las explotaciones clasificadas según el tipo de infección, excluyendo las negativas, se han resumido en la tabla XXXVIII y en la figura 27:

TIPO DE INFECCION EN LA EXPLOTACION	RESULTADOS DE LOS SUEROS			
	ELISA INMUNOCAPTURA		ELISA DIFERENCIAL	
	CVRP/VGET	NEGATIVOS	CVRP	VGET
CVRP	1.503	203	720	0
VGET	243	14	0	99
CVRP+ VGET	21	32	510	304
<b>TOTAL</b>	<b>1.768</b>	<b>249</b>	<b>1.230</b>	<b>403</b>

Tabla XXXVIII: Resultados finales de los sueros para las granjas positivas según el tipo de infección en la explotación.

Para el cálculo de las prevalencias dentro de las granjas sólo se han tenido en cuenta los sueros analizados por ELISA diferencial, y los sueros negativos en ELISA de inmunocaptura, es decir el número de muestras con resultado positivo a uno u otro virus dividido por el total de sueros estudiados en ese tipo de explotaciones.

**- Prevalencia en las granjas positivas al VGET:**

$$403/959 = 42,0\%$$

**- Prevalencia en las granjas positivas al CVRP:**

$$720/923 = 78,0\% \text{ en las granjas con infección sólo por CVRP.}$$

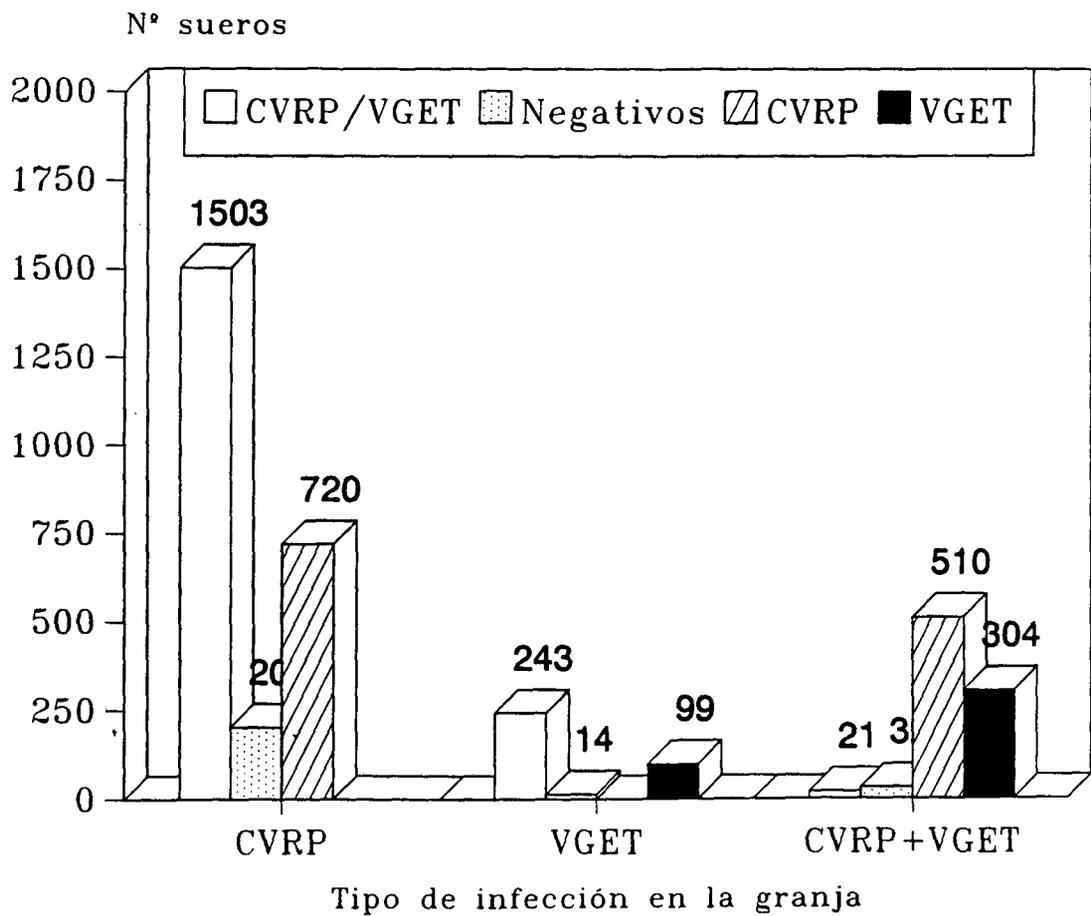


Figura 27: Resultados al ELISA diferencial de los sueros positivos al ELISA de inmunocaptura según el tipo de infección existente en la granja.

- En las granjas con infección por los dos coronavirus, la **prevalencia atribuible al CVRP** es como mínimo de:

$$510/846 = 60,3\%$$

- Mientras que la **prevalencia atribuible sólo al VGET** en estas granjas fue:

$304/846 = 35,93\%$
---------------------

#### 4.4.2.4. Prevalencia del VGET según el tamaño de la explotación.

Para obtener este dato sólo se han utilizado los resultados obtenidos en las granjas con anticuerpos frente a los dos coronavirus, ya que se han analizado todos los sueros recogidos en estas explotaciones y pueden ser representativos de las granjas de la población con infecciones por ambos virus. No hay diferencias significativas en la prevalencia del VGET según el tamaño de la granja cuando hay anticuerpos frente a ambas infecciones.

#### 4.4.3. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE COMPETICIÓN DE LOS SUEROS POSITIVOS AL VGET.

Se ha calculado el porcentaje de competición para los sueros clasificados como positivos al VGET, obteniendo una media de competición de 0,64 (64%) y una desviación estándar de 0,09 (9%). Estos porcentajes de competición no siguen una distribución normal (figura 28) por lo que hemos considerado los resultados del test de Kruskal-Wallis para el análisis de la varianza.

No se han detectado diferencias según el tamaño de la granja ni tampoco por la comarca ni la provincia de origen de los sueros.

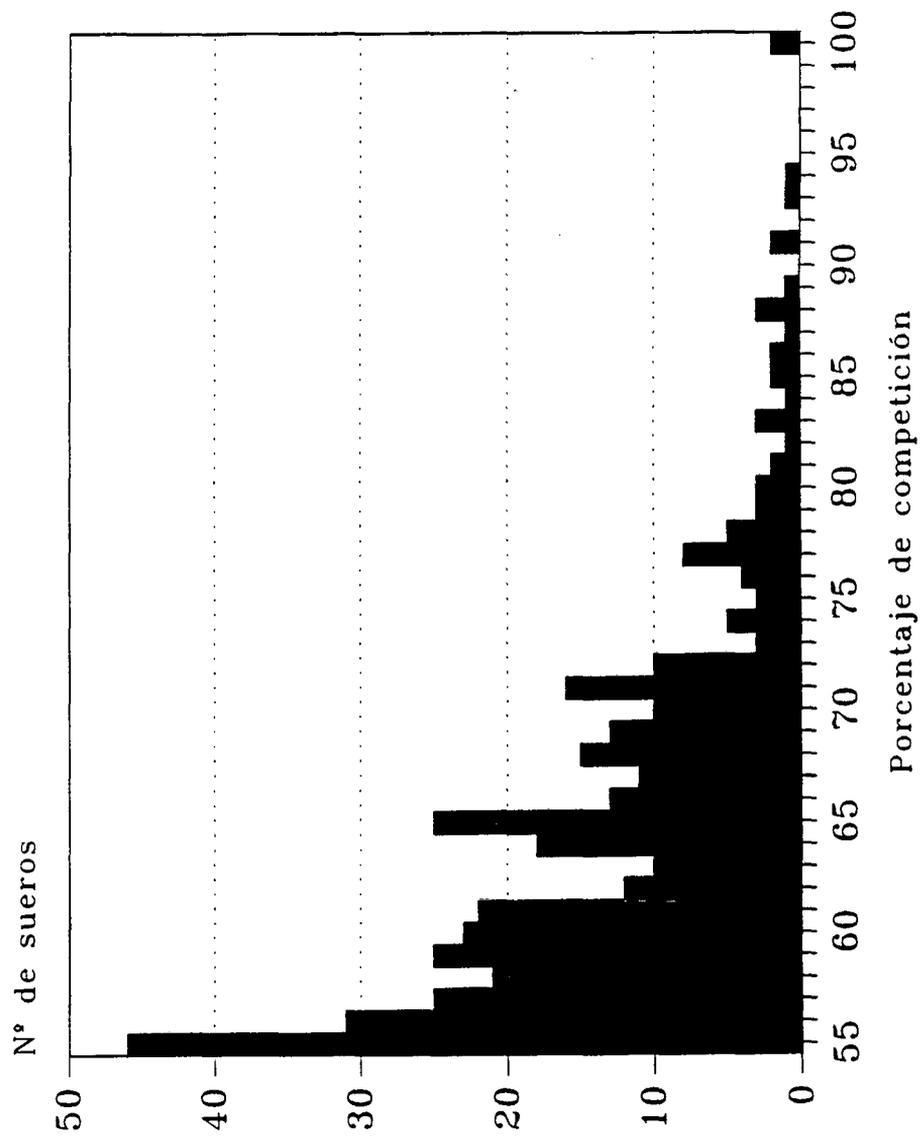


Figura 28: Distribución de los porcentajes de competición de los sueros VGET-positivos.

#### 4.4.3.1. Época del año

El análisis de la varianza de los porcentajes de competición según el momento de recogida de las muestras indica que sí hay diferencias significativas para la época del año. En primavera los sueros positivos al VGET tienen porcentajes de competición inferiores al resto del año (Tabla XXXIX, figura 29).

	Media	Desviación estándar
1 <sup>er</sup> trimestre	0,665	0,100
2 <sup>o</sup> trimestre	0,624	0,069
3 <sup>er</sup> trimestre	0,666	0,103
4 <sup>o</sup> trimestre	0,641	0,079

$H = 13,132 \quad p < 0,01$

Tabla XXXIX: Análisis de la varianza para los porcentajes de competición de los sueros positivos al VGET en cada período estudiado.

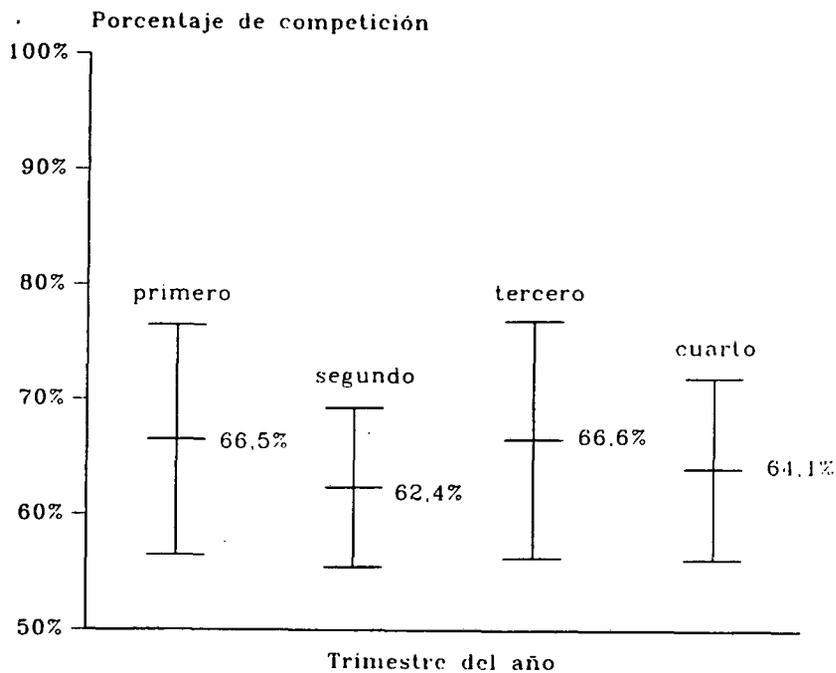


Figura 29: Porcentaje de competición medio para cada trimestre del año.



#### 4.4.3.2. Presencia de anticuerpos en la granja

Se han comparado las granjas que sólo presentaron anticuerpos frente al VGET con las que tuvieron también animales infectados por el CVRP, detectándose diferencias significativas para los porcentajes de competición (tabla XL, figura 30).

	Media	Desviación estándar
VGET	0,657	0,087
CVRP+VGET	0,639	0,085

$H = 4,870$ $p < 0,05$
------------------------

Tabla XL: Análisis de la varianza para los porcentajes de competición de los sueros según el tipo de infección de la granja

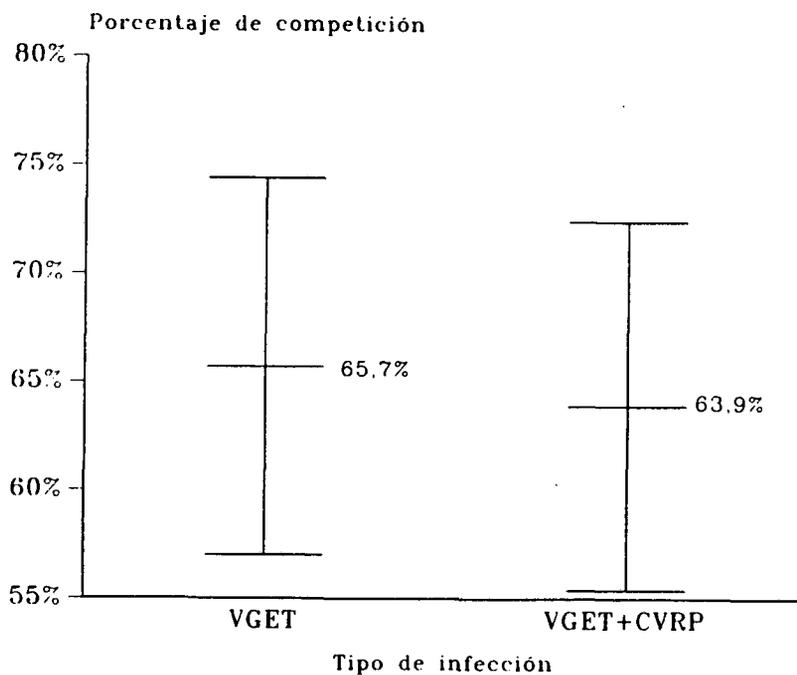


Figura 30: Porcentaje de competición medio según el tipo de infección en la granja.

#### 4.5. RESULTADOS DEL ESTUDIO RETROSPECTIVO DE LAS INFECCIONES POR EL CVRP Y EL VGET.

De los 424 sueros recogidos en la granja 1 se detectaron 64 sueros positivos al ELISA de inmunocaptura, todos ellos a partir de septiembre de 1986, no habiéndose detectado ningún suero positivo anterior a esa fecha. La distribución de las muestras negativas y positivas según el momento de su recogida se detallan en la tabla XLI y se representan en la figura 31.

PERIODO ESTUDIADO		POSITIVOS	NEGATIVOS
1985	MAYO-DICIEMBRE	0	159
	ENERO-JUNIO	0	154
	SEPTIEMBRE	7	20
1986	OCTUBRE	35	0
	NOVIEMBRE	4	20
	DICIEMBRE	18	7

Tabla XLI: Resultados del estudio retrospectivo en la "granja 1" durante el periodo estudiado.

A partir de los 64 sueros positivos se analizó una muestra de 23 sueros mediante el ELISA de competición, para detectar anticuerpos específicos frente a VGET, en caso de que existiera la infección, con un nivel de confianza del 99%. Todos los sueros dieron resultado negativo en la prueba diferencial, por lo que los anticuerpos detectados en los lechones mediante el ELISA de inmunocaptura se atribuyeron a la infección por el CVRP.

El estudio complementario realizado con otros 120 sueros de lechones para detectar anticuerpos anti-CVRP/VGET muestra una continuidad en la aparición de seropositivos durante el periodo estudiado. En la tabla XLII se indican el número de sueros positivos y negativos según la granja de procedencia, mientras que en la figura 32 se representan el total de sueros positivos y negativos por cada periodo estudiado.

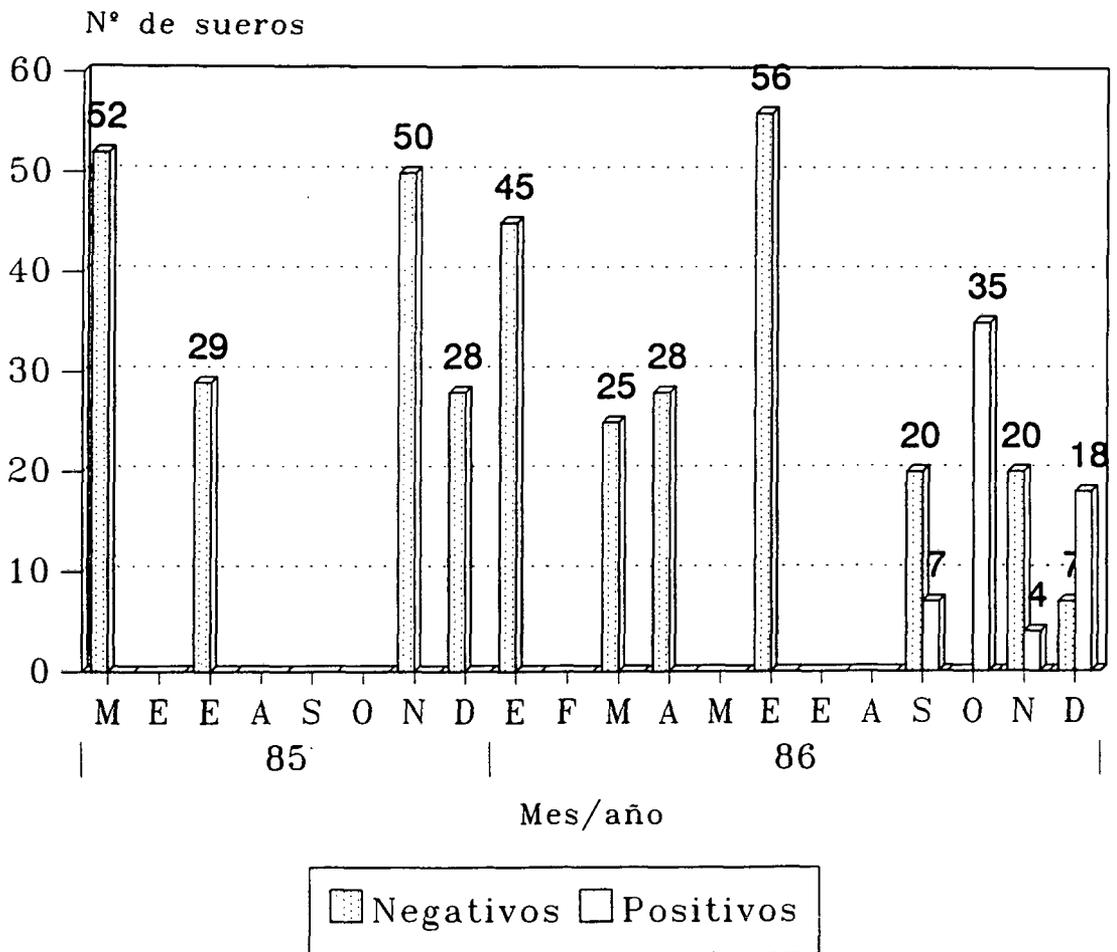


Figura 31: Resultados del estudio retrospectivo en la granja 1.

Granja	Positivos	Negativos	Prevalencia
1	22	18	55,0%
2	6	14	30,0%
3	12	12	50,0%
4	11	12	47,8%
5	1	3	25,0%
6	0	4	0,0%
7	4	1	80,0%
<b>Total</b>	<b>56</b>	<b>64</b>	<b>46,7%</b>

Tabla XLII: Distribución de los sueros positivos y negativos al ELISA de inmunocaptura, según la granja de origen, indicando la prevalencia de los positivos.

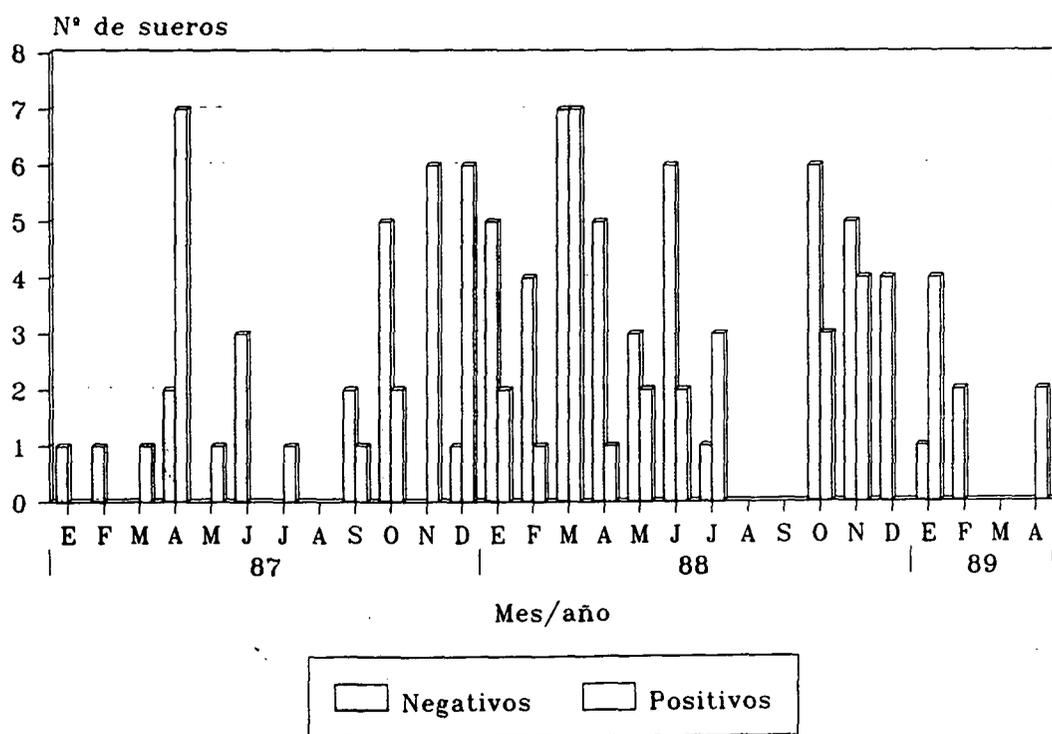


Figura 32: Estudio retrospectivo en varias granjas de cebo.

## 5. DISCUSSION

## 5.1. DISCUSION DE LA METODOLOGIA EMPLEADA

En los estudios epidemiológicos, así como en el diagnóstico rutinario, es normal acumular un elevado número de sueros para analizar, lo que requiere que la técnica elegida, además de fiable, sea sencilla de realizar, rápida en la obtención de resultados y lo más económica posible. La técnica de referencia para el diagnóstico serológico de la GET es la SN en placas de microtitulación, descrita por Toma *et al.* (146), utilizada en la mayoría de los sondeos serológicos y los análisis de rutina. Permite probar un gran número de sueros al mismo tiempo, pero tiene como inconvenientes que tarda más de 48 horas en dar los resultados, exige el empleo de cultivos celulares, resulta cara por el tipo de material que se necesita, y además no diferencia entre los anticuerpos frente al VGET o al CVRP. En nuestro caso, al utilizar sueros porcinos recogidos por medio de campañas de saneamiento, obteníamos muy poco volumen de muestra y no siempre estaban en las debidas condiciones, ya que muchas veces presentaban hemólisis y signos de contaminación en las épocas calurosas, lo que los hubiera hecho inservibles para la SN.

Entre los métodos existentes para el diagnóstico de las infecciones por el VGET/CVRP, escogimos el ELISA puesto que reúne las características apropiadas para realizar estudios epidemiológicos: es rápida, los sueros pueden utilizarse aunque tengan signos de hemólisis, puede automatizarse y resulta económica.

En el ELISA de inmunocaptura desarrollado por Lanza *et al.* (90), se utilizan dos Acm, dirigidos a diferentes epitopos de la proteína S del VGET, para el tapizado de las placas. Estos autores calcularon para la prueba una sensibilidad del 96% y una especificidad del 99% en comparación con la SN, por lo que consideramos que era el procedimiento de elección para seleccionar los sueros positivos al CVRP/VGET. El método se siguió exactamente igual a lo descrito por sus autores, lo que nos permitió usar un antígeno concentrado de fácil elaboración, que se fijó a la placa sin necesidad de purificarlo, gracias a su unión específica con los Acm del tapizado previo. Otros autores (10, 15), también destacan esta ventaja comparado con el ELISA indirecto, en el que se utiliza un antígeno purificado para incrementar la especificidad.

En los resultados globales de nuestro estudio epidemiológico, hemos apreciado una diferencia clara entre las absorbancias netas de los sueros positivos y las de los negativos, por lo que la posibilidad de obtener resultados falsos en uno u otro sentido es relativamente baja.

Para detectar los anticuerpos específicos del VGET es necesario emplear una técnica diferencial con Acm capaces de reconocer epitopos del VGET, que a su vez estén ausentes o modificados en el CVRP. En nuestro caso, la elección del Acm 1DB12 como discriminante en el ELISA diferencial se basó en la especificidad demostrada por Sánchez *et al.* (135) para reaccionar sólo con cepas del VGET y nunca con cepas de CVRP o de otros coronavirus relacionados.

Van Nieuwstadt *et al.* (105) demostraron que la cepa Erica del VGET no pudo ser reconocida por este Acm. Nosotros no tenemos ninguna referencia de que esta cepa se haya detectado fuera de Holanda, por lo que es poco probable que se encuentre de forma predominante en la población porcina. En cualquier caso, creemos que su presencia no alteraría los resultados que hemos obtenido.

Callebaut *et al.* (24) indicaron que la sensibilidad de este ELISA de competición es baja, pero que quizá se podría incrementar el número de detecciones de seropositivos utilizando otro Acm que reconociera algún epitopo específico del VGET, mejor expuesto en la superficie del virus y que no se bloqueara inespecíficamente por la unión de anticuerpos anti-CVRP.

Ya que hemos comprobado una elevada prevalencia de animales seropositivos al CVRP, cabe esperar que una gran parte de los sueros porcinos reaccionen inespecíficamente en las pruebas diferenciales, aunque con menor intensidad que los sueros que poseen anticuerpos frente al VGET. Por este motivo, es necesario "exigir" a los sueros positivos al VGET un porcentaje de competición superior al de la media del esperado para los sueros positivos al CVRP. Callebaut *et al.* (24), calcularon en un 55% el porcentaje mínimo de competición de los sueros positivos al VGET, incrementando la especificidad de los resultados, pero disminuyendo su sensibilidad para detectar a los sueros débilmente positivos, que de esta forma pueden considerarse erróneamente como sueros positivos sólo al CVRP.

En otras pruebas diferenciales, los Acm utilizados como discriminantes también están dirigidos a la proteína S, y son no neutralizantes, igual que el Acm 1DB12, por lo que se puede esperar un rendimiento similar para todas estas pruebas, es decir una buena especificidad, pero una sensibilidad baja. Por eso, estas técnicas diferenciales deben utilizarse más como prueba diagnóstica del conjunto de una granja, que como análisis individual, aunque en este caso puede ser útil recoger dos muestras de suero del mismo

animal en el intervalo de varias semanas antes de emitir un dictamen, o incluso combinar el diagnóstico serológico con la detección del virus en las tonsilas o en las heces.

Por el momento, parece difícil determinar la prevalencia real de animales positivos específicamente a cada uno de los virus utilizando sólo técnicas serológicas. Se necesitaría algún método capaz de detectar los anticuerpos frente al CVRP independientemente de la presencia de anticuerpos anti-VGET en el mismo suero.

## **5.2. DISCUSION DE LOS RESULTADOS GLOBALES**

El alto porcentaje de animales positivos al ELISA de inmunocaptura, (91,1%), así como el de las granjas (96,7%), indican la gran difusión de las infecciones por el CVRP/VGET en las granjas porcinas de toda Catalunya.

Estas prevalencias tan elevadas de anticuerpos nos hace suponer que la mayor parte de la respuesta inmunológica se debe a la infección por el CVRP, igual que lo descrito por otros autores en algunos países europeos (12, 20, 75, 121), los cuales citan porcentajes de infección anormalmente elevados sin aumento correlativo de los casos clínicos de GET.

En cambio, contrasta con las prevalencias encontradas en nuestro país en dos estudios epidemiológicos recientes, ya que en 1987, Cubero *et al.* (37) sólo encontraron una prevalencia del 15,61% de animales y del 22,29% de las granjas en la región de Murcia, mientras que un año después, Lanza *et al.* (91) cita un 30,5% de animales y el 60% de las granjas positivas en Castilla y León. Estas prevalencias bajas para el CVRP en comparación con lo observado en otros países y nuestros propios resultados, indican que posiblemente la infección estaba en aquellas fechas en fase de propagación y si se repitiera el estudio en aquellas zonas, la prevalencia encontrada en la actualidad sería probablemente muy superior.

## **5.3. DISCUSION DE LOS RESULTADOS EN EL ESTUDIO RETROSPECTIVO**

La aparición de altas tasas de anticuerpos anti-CVRP/VGET en ausencia de diarrea se describió por primera vez en Bélgica en 1984 (121) y poco tiempo después en la mayoría de las explotaciones de países vecinos. La diseminación por vía aerógena y el intercambio de cerdos portadores contribuyó a la rápida diseminación del CVRP.

Consideramos que podía tener interés hacer un estudio retrospectivo de la infección por el CVRP en dos fases, utilizando para ambas una colección de sueros de lechones de granjas catalanas. La primera fase tenía como meta determinar en qué

momento comenzaron a detectarse anticuerpos frente al CVRP y diferenciarlos de los producidos por el VGET en sueros recogidos en una explotación (denominada por nosotros granja 1), y en la segunda etapa se pretendía hacer un estudio a lo largo de varios años para observar la continuidad o no de la infección en sueros de siete explotaciones distintas.

La granja 1 no es de tipo convencional ya que recibe periódicamente animales de distinta procedencia, a los que se extrae sangre para realizar estudios de diversa índole. Por este motivo se eligió para el estudio retrospectivo ya que los resultados obtenidos en este establecimiento podían representar la situación inmunológica de las explotaciones porcinas de Catalunya. No se pudo precisar el origen exacto de cada suero, pero en cambio sí se conocía que los sueros seleccionados procedían siempre de granjas catalanas en buen estado sanitario. Las colecciones de sueros, obtenidos a partir de lechones de diversa procedencia reunidos en el mismo establecimiento, resultan muy útiles para los estudios epidemiológicos de enfermedades infecciosas. Maes y Haelterman (97), pudieron demostrar que este tipo de explotaciones pueden servir como fuente de contagio del VGET entre los lechones reunidos.

En nuestro estudio retrospectivo, no podemos asegurar que la infección por el CVRP se iniciara en la misma granja, pero la fácil transmisión de este virus probablemente contribuyó a que, tras la llegada de algunos animales infectados, la explotación se convirtiera en un foco de infección con la permanencia de portadores.

Los primeros sueros positivos fueron detectados en la "granja 1" en septiembre de 1986, cuando ya se había extendido la infección a una buena parte de los países de Europa occidental. Además, esta fecha coincide con el inicio de las relaciones comerciales con la Comunidad Europea y la importación de gran número de lechones destinados al cebo, lo que hace suponer que la introducción no fue por vía aerógena, a partir de países vecinos, sino más bien por medio de portadores. Una vez en nuestro país la difusión aérea sí que habría cobrado importancia en la rápida extensión del CVRP.

En los estudios serológicos de diferentes agentes diarreicos realizados durante el otoño-invierno de 1988/89 en España (130), no se detectaron anticuerpos anti-VGET por seroneutralización. Se asume que tampoco se había generalizado la infección por el CVRP entre las explotaciones estudiadas, tanto de animales de cebo de ciclo abierto como de ciclo cerrado y procedentes de diversas provincias españolas, aunque no se detalla su origen en el trabajo. En cambio, Lanza *et al.* (91) ya observaron seroconversión sólo frente al CVRP en muestras de reproductoras recogidas durante 1988. En la región de Murcia, Cubero *et al.* (37) detectaron también la existencia de anticuerpos anti-CVRP en sueros recogidos durante 1987. Yus *et al.* (159), en un estudio desarrollado en 1989 con muestras recogidas en un matadero en Segovia, atribuyeron los anticuerpos detectados por

SN a la infección por el CVRP, aunque no realizaron ningún método diferencial.

Con estas referencias previas, podemos considerar que el estudio retrospectivo en lechones nos ha permitido determinar con bastante certeza que el inicio de la infección por el CVRP en Catalunya fue en los meses previos a septiembre de 1986. La detección de sueros positivos alrededor de esta fecha coincide con la introducción en Cataluña de ganado porcino vivo destinado a cebo o a mejora y procedente de países de la C.E. Nuestros resultados sugieren que el CVRP se introdujo en las granjas porcinas de Cataluña a partir de cerdos portadores procedentes de países con alta prevalencia de infección por el CVRP.

En el estudio posterior a lo largo de varios años con otros 120 sueros de lechones, queda reflejada la progresiva aparición y persistencia de sueros positivos al ELISA de inmunocaptura en varias granjas porcinas, distantes entre sí y sin brotes de diarrea durante el periodo estudiado.

#### **5.4. DISCUSION DE LOS RESULTADOS AL CVRP**

Aunque parte de los sueros positivos en el ELISA de inmunocaptura han resultado ser específicamente positivos al VGET en el ELISA diferencial, no se puede descartar que los animales estuvieran infectados simultáneamente por ambos virus, y que la prevalencia calculada para ambos virus probablemente se corresponda también con el porcentaje de infección sólo por el CVRP, algo que no es posible demostrar.

Las posibles consecuencias de la infección por el CVRP, sola o asociada a otros agentes patógenos del tracto respiratorio, no están precisadas, aunque quizá sería más interesante estudiar su evolución en las granjas de cebo, donde los problemas respiratorios y los consiguientes retrasos en el crecimiento son causa de grandes pérdidas económicas (46, 88, 98). En las explotaciones de reproductoras no se han apreciado signos de ningún tipo, excepto la aparición de anticuerpos y la interferencia con el diagnóstico de la GET, pero no se le ha dado especial importancia en la clínica porcina.

Considerando las absorbancias netas de las lecturas en el ELISA de inmunocaptura como una buena aproximación al título de los sueros por SN (87), hemos observado un gran número de positivos con absorbancias muy elevadas que podrían indicar una infección reciente, o mejor aún, reinfecciones periódicas que mantuvieran altos títulos de anticuerpos a lo largo del periodo estudiado.

#### 5.4.1. TAMAÑO DE LA EXPLOTACIÓN

Los valores de prevalencia superiores corresponden a sueros pertenecientes a explotaciones con más de 100 reproductoras, y a medida que disminuye el tamaño de la granja desciende el porcentaje de positivos, con diferencias de significativas estadísticamente. Las granjas grandes presentan un valor de R.R. de 1,11, es decir que en este tipo de explotaciones existe un riesgo de 1,11 veces mayor de estar infectadas por el CVRP en relación a las demás. Para las granjas pequeñas el valor de R.R. fue de 0,85, y por tanto estas granjas presentan una menor prevalencia en relación a las demás.

Estos resultados coinciden con lo encontrado en estudios similares (37, 62, 87) y también nos indican que resulta más fácil que se introduzca la infección en las granjas de tipo industrial que en las familiares. Esta diferente distribución de la prevalencia puede explicarse porque las granjas con un número grande de animales reponen reproductoras con mayor frecuencia, incrementando la posibilidad de introducir cerdas portadoras. En cambio, las explotaciones pequeñas, de carácter familiar, suelen autoabastecerse con su propia producción, y en algunos casos la reposición se hace a partir de granjas industriales vecinas. Así se explicaría que primero se haya generalizado la infección por el CVRP en las explotaciones grandes y el avance en las pequeñas sea más lento.

Hemos observado que el 100% de las granjas grandes y el 91% de las pequeñas poseen algún animal con anticuerpos, lo que confirma la difusión casi total del CVRP a todo tipo de granjas en Catalunya. La transmisión por vía aerógena ha facilitado la diseminación del virus entre granjas más o menos cercanas, sin que sea siempre necesaria la introducción de portadores (120). Se trata de una infección que no puede atribuirse a malas condiciones en la explotación y su presencia no parece condicionada al control de portadores únicamente.

Hemos observado escasas diferencias en los niveles de absorbancia de los sueros positivos, aunque resultan significativamente superiores para las granjas grandes respecto a las demás durante los tres primeros trimestres del año. En cambio, en el último periodo del año, las absorbancias no tienen diferencias destacables por el tamaño de explotación. Podemos interpretar que, en las granjas grandes, la infección ha estado presente a lo largo de todo el año con altos niveles de absorbancia, mientras que en las pequeñas, el nivel de infección se ha ido incrementando hasta alcanzar al de las explotaciones más grandes.

#### 5.4.2. ORIGEN DE LOS SUEROS

La irregular distribución del censo porcino en las cuatro provincias no está acompañada de importantes diferencias en la aparición de sueros positivos, lo que es lógico después de las altas prevalencias encontradas para la población.

A pesar de que Tarragona es la provincia con un menor número de explotaciones y animales destinados a la reproducción, ha presentado el mayor índice de prevalencia, con R.R. y O.R. significativos para la aparición de anticuerpos respecto a las otras provincias. Lo mismo sucede con Lleida, que es la que posee el mayor censo de porcino de toda Catalunya, siendo la mayoría cerdos para engorde. En cambio, Girona es la provincia que ha presentado una prevalencia total más baja, inferior al 90%

El análisis de la varianza de las absorbancias de los sueros positivos ha permitido demostrar que Tarragona posee también los sueros con absorbancias superiores, significativamente diferentes a Barcelona y Girona, mientras que Barcelona es la provincia cuyos sueros tienen los niveles de absorbancia inferiores, con diferencias significativas a los de las otras tres provincias. Esto hace sospechar que el virus, a pesar de encontrarse muy extendido, no está en la misma fase de infección en las cuatro provincias. La introducción de cerdos para cebo en Tarragona y Lleida procedentes de otras áreas infectadas o incluso el paso de camiones de transporte de ganado por las carreteras de estas provincias podrían ser las causas de reinfecciones. En cambio en Barcelona, el mayor número de las explotaciones son de reproductoras de ciclo cerrado y apartadas de las principales rutas de transporte de ganado procedentes de Europa, por lo que sería más difícil un contacto repetido con el virus.

Para poder estudiar la relación de la infección con las comarcas de origen, agrupamos arbitrariamente las que tienen un censo de reproductoras similar. De los cuatro grupos comarcales, el que reunía las de censo entre 20 y 75 mil cerdas, fue el que tuvo mayores índices de prevalencia comparativamente al resto. Este grupo, junto al inmediatamente inferior (comarcas entre 10 y 20 mil reproductoras) dio una media de los niveles de absorbancia superior al de las comarcas con menos de 10 mil reproductoras. Parece evidente que en las comarcas con mayor censo la posibilidad de contactos con el virus es mayor, lo que puede atribuirse casi con certeza al mayor número de animales. Henningsen *et al.* (62) observaron que el riesgo de infección era mayor en granjas adyacentes a explotaciones positivas.

### 5.4.3. ÉPOCA DEL AÑO

Al estudiar esta variable en relación a los resultados obtenidos nos hemos encontrado que al no haber recogido la muestra homogéneamente en las cuatro provincias a lo largo del año, se puede haber introducido algún elemento de confusión, por lo que los resultados deben interpretarse con cautela.

Para el total de las muestras se observó un aumento paulatino de la prevalencia en los tres primeros trimestres y una estabilidad entre los dos últimos. Esto podría indicar un avance de la infección, o bien una reinfección de los animales, durante los tres primeros trimestres llegando al equilibrio en el último periodo. El mismo efecto se observa para los niveles de absorbancia, con diferencias significativas entre todos los periodos excepto para los dos últimos, los cuales presentan altos valores de prevalencia y absorbancia media.

No hemos comprobado, por tanto, una estacionalidad de la infección, tal como señalan otros autores en estudios epidemiológicos similares. Así, Lanza (87) observó una prevalencia progresivamente mayor a lo largo del año, lo que atribuyó a los inicios de la extensión del CVRP en las explotaciones de Castilla y León. En otros estudios (121) se ha señalado que la infección por el CVRP no sigue unos patrones determinados para todas las explotaciones, ya que mientras en unas la presencia de infección es constante, en otras desaparece y puede volver a reintroducirse más adelante. En un estudio retrospectivo con sueros recogidos en 1984, Brown y Paton (21) citan que la seroconversión al CVRP se detectó en una explotación en ausencia de síntomas de GET, desapareciendo sin extenderse a otras granjas, hasta que en 1986 volvió a revelarse un incremento de anticuerpos, esta vez en un mayor número de granjas.

La prevalencia a lo largo del año según el tamaño de la explotación, revela que en las granjas pequeñas el porcentaje de sueros positivos era sensiblemente inferior al principio del estudio (74,8%) y que fue aumentando a lo largo del año hasta alcanzar el 88,5%, pero sin llegar a los mismos niveles que en explotaciones de mayor número de animales. Esto confirmaría los resultados comentados anteriormente para el tamaño de la explotación, con prevalencias totales superiores para las grandes y más bajas para las pequeñas.

En el segundo trimestre del año hemos observado una prevalencia inferior a la del primer trimestre en las granjas de tamaño intermedio. El análisis estratificado según la provincia de origen nos indica que en este periodo el origen de los sueros es la causa de la variación en la prevalencia y no la época del año considerada. De esta forma, comprobamos que la mayor parte de los sueros recogidos durante el segundo trimestre procedían de Barcelona, mientras que no se obtuvo ninguno de Tarragona. Todo ello ha

producido un descenso de la prevalencia en este periodo, pero que no puede atribuirse a una estacionalidad, sino al origen de las muestras.

No hemos encontrado diferencias al comparar el número de granjas positivas según la época del año, probablemente porque la muestra ha sido pequeña en relación a la alta prevalencia encontrada. Sí se ha observado en los cálculos una tendencia a incrementar el porcentaje de granjas positivas a lo largo de 1991.

## **5.5. DISCUSION DE LOS RESULTADOS AL ELISA DIFERENCIAL**

De la muestra seleccionada a partir de los sueros positivos por ELISA de inmunocaptura, el 24,7% tenían anticuerpos específicos frente al VGET. Ya que los sueros no se seleccionaron al azar, este dato no sirve para extrapolar la prevalencia al total de la población aunque sí es indicativo de la presencia con valores de consideración de la infección por el VGET en reproductoras de Catalunya.

Se debe tener en cuenta que la prevalencia podría ser mayor, ya que la técnica empleada tiene una baja sensibilidad y pueden haberse producido falsos negativos, pero también podría ser inferior si consideramos que ninguno más de los sueros positivos por ELISA de inmunocaptura hubiera sido positivo al VGET, y en este caso, la prevalencia podría disminuir al 11,8% de los sueros recogidos. Estos datos son sólo especulativos, pero confirman de todas formas la existencia de la infección por el VGET.

En cambio, la prevalencia mínima al CVRP sí que puede considerarse como el porcentaje restante en el ELISA diferencial, es decir, al menos el 75,3% de los sueros tienen anticuerpos sólo debidos al CVRP y no poseen anticuerpos específicos al VGET. Probablemente este porcentaje sea superior ya que los sueros positivos al VGET pueden serlo también al CVRP.

### **5.5.1. PREVALENCIA DE LAS GRANJAS**

En nuestro estudio epidemiológico nos ha parecido más interesante tener en cuenta los resultados de la prevalencia de granjas, las cuales sí forman una muestra representativa de las explotaciones de Catalunya.

De las granjas positivas por ELISA de inmunocaptura, el 31,5% presentaron anticuerpos frente al VGET, con o sin la presencia de anticuerpos anti-CVRP, siendo este valor la prevalencia mínima de granjas infectadas por el VGET.

Las granjas pequeñas tienen menor índice de infección que las medianas o grandes, aunque no se ha observado una asociación estadística entre el tamaño de la granja y la aparición o no de anticuerpos específicos. Esto significa que todas las explotaciones están expuestas por igual al VGET.

En cambio, los datos de granjas infectadas sólo por el CVRP nos están dando información, no tanto de la prevalencia de infección por este virus, sino más bien de la no infección por el VGET, a pesar de ser positivas al ELISA de inmunocaptura. Al encontrar una prevalencia relativamente elevada de explotaciones con infección por el VGET estamos disminuyendo la prevalencia del CVRP al descartar la posible infección simultánea, por lo que los resultados no pueden interpretarse literalmente. La presencia de anticuerpos sólo frente al CVRP en granjas positivas no muestra variaciones de relevancia estadística entre los tres tipos de explotaciones consideradas, es decir, que tenemos las mismas posibilidades de encontrar una granja que no esté infectada por el VGET sea cuál sea su tamaño.

#### 5.5.2. PREVALENCIA DENTRO DE LAS GRANJAS

Para el cálculo de la prevalencia dentro de cada tipo de granja sólo debemos considerar los resultados obtenidos en las positivas a ambos virus, en las cuales se han estudiado todos los sueros recogidos. La prevalencia obtenida, un 35,93% es equivalente a la encontrada en otros estudios realizados en áreas con GET enzoótica, sin presencia de brotes atribuibles a la enfermedad clásica y en granjas con animales aparentemente sanos (86). Este valor es representativo de aquellas granjas con anticuerpos frente al CVRP/VGET, que probablemente engloban la mayoría de las explotaciones positivas al VGET. En Catalunya, este porcentaje de infección en las granjas de reproductoras puede ser la causa de algunos casos de diarrea en lechones nacidos de cerdas jóvenes, que han tenido poco contacto con el virus y no pueden proteger con las IgA de la leche a sus crías. De esta forma se consigue perpetuar la situación a una enfermedad enzoótica cuya difusión más lenta no permite la inmunización activa de todos los animales.

El tamaño de la explotación no parece influir en la prevalencia atribuible sólo al VGET en las granjas con anticuerpos frente a ambos virus.

### 5.5.3 PORCENTAJE DE COMPETICIÓN

En los sueros positivos al VGET se ha calculado el porcentaje de competición en relación al porcentaje establecido para el suero testigo positivo al CVRP. Este dato puede indicarnos el grado de positividad de cada suero, ya que es de esperar un mayor bloqueo de la unión del monoclonal cuanto mayor sea el título de ese suero.

No parecen existir variaciones importantes en el porcentaje de competición si tenemos en cuenta el tamaño de la explotación ni el origen de los sueros. En cambio, sí que se ha observado una media algo inferior y una desviación estándar muy pequeña para los sueros positivos del segundo trimestre estudiado, de difícil explicación con los pocos datos que hemos recogido.

Los sueros positivos obtenidos en granjas infectadas únicamente por el VGET tienen un porcentaje de competición superior a las que tienen infección por ambos virus. Creemos que la competición entre los anticuerpos anti-CVRP y anti-VGET, podría interferir en parte con la unión específica de todos los anticuerpos anti-VGET, de la misma forma que se ha detectado un porcentaje de bloqueo inespecífico para la unión de los Acm con el antígeno en los sueros positivos al CVRP.

## 6. CONCLUSIONES

**PRIMERA:** La infección por el coronavirus respiratorio porcino y/o el virus de la gastroenteritis transmisible (CVRP/VGET) está muy extendida por toda Catalunya, ya que se han detectado como positivas entre el 90,2 y el 92,0% de las cerdas reproductoras, y entre el 96,3 y el 98,1% de las granjas de reproductoras.

**SEGUNDA:** La prevalencia de infección por el CVRP/VGET es mayor en las explotaciones con más de 100 reproductoras que en el resto. En las granjas con menos de 20 cerdas hemos observado que la infección avanzó a lo largo del año 1991, hasta alcanzar los mismos niveles de infección que en las demás granjas. En las comarcas con mayor censo de reproductoras se registran los índices de prevalencia más altos.

**TERCERA:** Cerca de una cuarta parte de los sueros examinados por ELISA diferencial son positivos específicamente al VGET (24,7%), mientras que el resto de los sueros estudiados se han considerado positivos sólo al CVRP.

**CUARTA:** La prevalencia mínima de granjas infectadas por el VGET, con o sin participación del CVRP, es del 31,5%. Dentro de las granjas infectadas por ambos virus la prevalencia de sueros positivos al VGET se ha calculado en 35,9%.

**QUINTA:** La infección por el CVRP se detectó por primera vez en sueros de lechones recogidos en septiembre de 1986. A partir de esta fecha hemos comprobado que la infección se mantiene en la población hasta el final del estudio retrospectivo, en julio de 1989.

**Y SEXTA:** Las pruebas serológicas no diferenciales, como el ELISA de inmunocaptura, no tienen utilidad para la detección de animales seronegativos al VGET en las granjas porcinas de Catalunya, debido a la altísima prevalencia de infección por el CVRP. En la mayoría de los casos es necesario emplear una técnica diferencial, como el ELISA de competición.

## 7. RESUMEN

Se ha realizado un muestreo estratificado de las explotaciones de reproductoras porcinas para determinar la prevalencia de las infecciones por el coronavirus respiratorio porcino (CVRP) y el virus de la gastroenteritis transmisible porcina (VGET) en Catalunya. Al carecer de datos en esta zona, se hizo un estudio previo en sueros de matadero para determinar su prevalencia, y a partir de estos datos se elaboró el muestreo. Las muestras de suero se estudiaron para la presencia de anticuerpos frente al CVRP y/o VGET, mediante un ELISA de inmunocaptura, obteniendo una alta prevalencia de infección (91,1% de los sueros y 96,7% de las granjas). De los sueros que dieron positivo a esta primera prueba laboratorial, se seleccionó una muestra de sueros de cada una de las granjas positivas para determinar la presencia de anticuerpos específicos frente al VGET. Se obtuvo una prevalencia de anticuerpos anti-VGET del 24,7% de los sueros y del 31,5% de las granjas.

En el estudio epidemiológico, comprobamos que la presencia de anticuerpos frente a ambas infecciones está relacionado con una población elevada de animales, tanto si se trata de explotaciones de gran tamaño, como de comarcas con un alto censo de ganado porcino. En las explotaciones de más de 20 animales la infección por el CVRP está estabilizada; sin embargo, en las menores se observa una progresión de la infección a lo largo del periodo estudiado. No hemos detectado estacionalidad de la infección por el virus respiratorio y esto sugiere que persiste en las explotaciones durante todo el año mediante cerdos portadores.

Simultáneamente, llevamos a cabo un estudio retrospectivo en sueros de lechones de diversa procedencia para determinar la fecha más probable de introducción del CVRP en Catalunya, encontrando los primeros positivos en septiembre de 1986.

## 8. BIBLIOGRAFIA

1. AN SH, KWEON CH, LEE JB, KIM YH y KIM SJ, 1986  
[Studies on the rapid diagnosis of transmissible gastroenteritis in pigs using monoclonal antibody.] *Res Rep Rural Dev Adm (Livestock & Veterinary)*, 28: 32-39
2. ANDRIES K, 1982  
Pathogenese en epizootiologie van "vomiting and wasting disease", een virale infectie big het varken. Ph.D. Tesis Med. Fac. Diergeneesk. Rijksuniv. Gent (Bélgica)
3. ANDRIES K, 1989  
Hemagglutinating encephalomyelitis virus. En: *Virus infections of porcines*, pp: 177-185. PENZAERT MB (ed.), 1989. Elsevier Science Publishers, Amsterdam
4. ASAGI M, OGAWA T, MINETOMA T, SATO K y INABA Y, 1986  
Detection of transmissible gastroenteritis virus in feces from pigs by reversed passive hemagglutination. *Am J Vet Res*, 47: 2161-2164
5. AYNAUD JM, BERNARD S, BOTTREAU E, LANTIER I, SALMON H y VANNIER P, 1991  
Induction of lactogenic immunity to transmissible gastroenteritis virus of swine using an attenuated coronavirus mutant able to survive in the physicochemical environment of the digestive tract. *Vet Microbiol*, 26: 227-239
6. AYNAUD JM, BERNARD S y SHIRAI J, 1987  
Les entérites virales du porcelet: données récentes sur l'immunisation de la truie contre la gastroentérite transmissible (TGE) en vue de la protection passive du porcelet. *VIII Symp Anaporc, Expoaviga-87 (Barcelona)*: 32-39
7. AYNAUD JM, SALMON H, BOTTREAU E, BERNARD S y LANTIER I, 1988  
Transmissible Gastroenteritis: immunization of the pregnant sow with the 188-SG strain of TGE coronavirus (Nouzilly strain) using the intramammary route. *Proc 10th Congress IPVS*, 1988, Rio de Janeiro (Brasil), p. 202
8. AYNAUD JM, VANNIER PH, MARTAIN L y CARIOLET R, 1984  
TGE: Efecto de una vacuna inactivada en emulsión para establecer inmunidad en las cerdas de una explotación que ha estado infectada durante más de un año. *Proc 8th Congress IPVS*, 1984, Gent (Bélgica), p. 52
9. BAE I, JACKWOOD DJ, BENFIELD DA, SAIF LJ, WESLEY RD y HILL H, 1991  
Differentiation of transmissible gastroenteritis virus from porcine respiratory coronavirus and other antigenically related coronaviruses by using cDNA probes specific for the 5' region of the S glycoprotein gene. *J Clin Microbiol*, 29: 215-218
10. BALSARI A, POLI G, TONIOLO A y SIMONE F, 1981  
Gastroenterite trasmissibile del suino (TGE): rilievo degli anticorpi con la tecnica ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). *Clin Vet*, 104: 19-28
11. BENFIELD DA, JACKWOOD DJ, BAE I, SAIF LJ y WESLEY RD, 1991  
Detection of transmissible gastroenteritis virus using cDNA probes. *Arch Virol*, 116: 91-106

12. BEREITER M, HASLER J y KELLER H, 1988  
Transmissible Gastroenteritis (TGE) in der Schweiz: Antikörperpersistenz nach Infektion und seroepidemiologische Untersuchungen zur Bedeutung des TGE-Virus als Durchfallerreger. *Schweiz Arch Tierh*, **130**: 237-248
13. BERNARD S, BOTTREAU E, AYNAUD JM, HAVE P y SZYMANSKY J, 1989  
Natural infection with the porcine respiratory coronavirus induces protective lactogenic immunity against transmissible gastroenteritis. *Vet Microbiol*, **21**: 1-8
14. BERNARD S, LANTIER I, LAUDE H y AYNAUD JM, 1986  
Detection of transmissible gastroenteritis coronavirus antigens by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay technique. *Am J Vet Res*, **47**, 2441-2444
15. BERNARD S, LAUDE H, LANTIER I, BOTTREAU E y AYNAUD JM, 1986  
Détection du coronavirus de la GET et des anticorps spécifiques par une technique ELISA mixte mettant en oeuvre anticorps monoclonaux et polyclonaux. *J Rech porc France*, **18**: 363-370
16. BOHAC J, DERBYSHIRE JB y THORSEN, 1975  
The detection of transmissible gastroenteritis viral antigens by immunodiffusion. *Can J Comp Med*, **39**: 67-75
17. BOHL EH, 1989  
Transmissible gastroenteritis virus (Classical enteric variant). En: Virus infections of porcines, pp: 139-153, PENZAERT MB (ed.), 1989, Elsevier Science Publishers, Amsterdam
18. BOHL EH, FREDERICK GT y SAIF LJ, 1975  
Passive immunity in transmissible gastroenteritis of swine: intramuscular injection of pregnant swine with a modified live-virus vaccine. *Am J Vet Res*, **36**: 267-271
19. BOHL EH, GUPTA RKP, McCLOSKEY LW y SAIF L, 1972  
Immunology of transmissible gastroenteritis. *J Am Vet Med Assoc*, **160**: 543-549
20. BROWN I y CARTWRIGHT S, 1986  
New porcine coronavirus? (Correspondence). *Vet Rec*, **119**: 282-283
21. BROWN I y PATON DJ, 1991  
Serological studies of transmissible gastroenteritis in Great Britain, using a competitive ELISA. *Vet Rec*, **128**: 500-503
22. CALLEBAUT P, CORREA I, PENZAERT M, JIMENEZ G y ENJUANES L, 1988  
Antigenic differentiation between transmissible gastroenteritis virus of swine and a related porcine respiratory coronavirus. *J Gen Virol*, **69**: 1725-1730
23. CALLEBAUT P, COX E, PENZAERT MB y VAN DEUN K, 1990  
Induction of milk IgA antibodies by porcine respiratory coronavirus infection. En: Biochemistry and biology of coronaviruses. CAVANAGH D y BROWN D (ed.).
24. CALLEBAUT P, PENZAERT MB y HOOYBERGHS J, 1989  
A competitive inhibition ELISA for the differentiation of serum antibodies from pigs infected with transmissible gastroenteritis virus (TGEV) or with the

TGEV-related porcine respiratory coronavirus. *Vet Microbiol*, 20: 9-19

25. CEPICA A y DERBYSHIRE JB, 1983  
Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and spontaneous cell-mediated cytotoxicity against cells infected with porcine transmissible gastroenteritis virus. *Can J Comp Med*, 47: 298-303
26. CEPICA A y DERBYSHIRE JB, 1986  
Characterisation of the effector cells in antibody-dependent and spontaneous cell-mediated cytotoxicity in swine against target cells infected with transmissible gastroenteritis virus. *Res Vet Sci*, 41: 70-75
27. CHEN KS y KAHN DE, 1985  
A double-protease-resistant variant of transmissible gastroenteritis and its ability to induce lactogenic immunity. *Am J Vet Res*, 46: 1632-1636
28. CHU RM, LI NJ, GLOCK RD y ROSS RF, 1982  
Applications of peroxidase-antiperoxidase staining technique for detection of transmissible gastroenteritis virus in pigs. *Am J Vet Res*, 43: 77-81
29. COLL J y PERELLO B,  
Gastroenteritis porcina. Estudio de un brote. *Noticias Neosán*, 125-137
30. CONCELLON A, 1960  
Gastroenteritis epizootica transmisible de los cerdos. *Bol Inf Cons Gen Col Vet Esp*, 7: 479-483
31. COOK DR, HILL HT y TAYLOR JD, 1991  
Oral transmission of transmissible gastroenteritis virus by muscle and lymph node from slaughtered pigs. *Aust Vet J*, 68: 68-70
32. CORREA I, GEBAUER F, BULLIDO MJ, SUÑE C, BAAY MFD, ZWAAGSTRA KA, POSTHUMUS WPA, LENSTRA JA y ENJUANES L, 1990  
Localization of antigenic sites of the E2 glycoprotein of transmissible gastroenteritis coronavirus. *J Gen Virol*, 71: 271-279
33. CORREA I, JIMENEZ G, SUÑE C, BUDILLO MJ y ENJUANES L, 1988  
Antigenic structure of the E2 glycoprotein from transmissible gastroenteritis coronavirus. *Virus Res*, 10: 77-94
34. COX E, HOOYBERGHS J y PENZAERT MB, 1990  
Sites of replication of a porcine respiratory coronavirus related to transmissible gastroenteritis virus. *Res Vet Sci*, 48: 165-169
35. COX E, PENZAERT MB, CALLEBAUT P y VAN DEUN K, 1990  
Intestinal replication of a porcine respiratory coronavirus closely related antigenically to transmissible gastroenteritis virus. *Vet Microbiol*, 23: 237-243
36. CUBERO MJ, LANTIER I y BERNARD S, 1988  
TGE virus antibodies: Comparison of several techniques. *Proc 10th Congress IPVS*, Rio de Janeiro (Brasil), p. 197

37. CUBERO MJ, LEON L, CONTRERAS A y ASTORGA R, 1990  
Epidemiological enquire by serological survey (ELISA) of transmissible gastroenteritis virus (TGEV) and porcine respiratory coronavirus (PRCV) in the region of Murcia (Spain). *Proc 11th Congress IPVS*, Lausanne (Suiza), p. 264
38. DEBOUCK P y PENZAERT MB, 1984  
Diarrea epidémica porcina: cinética de los anticuerpos adquiridos activa y pasivamente y el efecto de la reinfección. *Proc VIII Congress IPVS*, Ghent (Bélgica), p. 57
39. DELMAS B, GELFI J y LAUDE H, 1986  
Antigenic structure of transmissible gastroenteritis virus. II. Domains in the peplomer glycoprotein. *J Gen Virol*, **67**: 1405-1418
40. DELMAS B, RASSCHAERT D, GODET M, GELFI J y LAUDE H, 1990  
Four major antigenic sites of the coronavirus transmissible gastroenteritis virus are located on the amino-terminal half of spike glycoprotein S. *J Gen Virol*, **71**: 1313-1323
41. DERBYSHIRE JB, 1989  
The interferon sensitivity of selected porcine viruses. *Can J Vet Res*, **53**: 52-55
42. DEUN K VAN, COX E, CALLEBAUT P y PENZAERT M, 1990  
Milk of sows infected with the porcine respiratory coronavirus: induction of IgA antibodies against transmissible gastroenteritis virus and protective capacity against intestinal infection in piglets. *Proc 11th Congress IPVS*, Lausanne (Suiza), p. 263
43. DOYLE LP y HUTCHINGS LM, 1946  
A transmissible gastroenteritis in pigs. *J Am Vet Med Assoc*, **108**: 257-259
44. DROLET R, MORIN M y FONTAINE M, 1985  
Fluid therapy trials in neonatal piglets infected with transmissible gastroenteritis virus. *Can J Comp Med*, **49**: 357-360
45. DULAC GC, RUCKERBAUER GM y BOULANGER P, 1977  
Transmissible gastroenteritis: Demonstration of the virus from field specimens by means of cell culture and pig inoculation. *Can J Comp Med*, **41**: 357-363
46. DURET CH, BRUN A, GUILMOTO H y DAUVERGNE M, 1988  
Isolement, identification et pouvoir pathogène chez le porc d'un coronavirus apparenté au virus de la gastro-entérite transmissible. *Rec Méd Vét*, **164**: 221-226
47. FITZGERALD GR y WELTER CJ, 1990  
The effect of an oral TGE vaccine on eliminating enzootic TGE virus from a herd of swine. *Agri-Practice*, **11**: 25-29
48. FITZGERALD GR, WELTER MW y WELTER CJ, 1986  
Improving the efficacy of oral TGE vaccination. *Vet Med*, **81**: 184-187
49. FORMAN AJ, 1991  
Infection of pigs with transmissible gastroenteritis virus from contaminated carcasses. *Aust Vet J*, **68**: 25-27

50. FREDERICK GT y BOHL EH, 1976  
Local and systemic cell-mediated immunity against transmissible gastroenteritis, an intestinal viral infection of swine. *J Immunol*, **116**: 1000-1004
51. GARWES DJ, 1987  
Characterisation of the antigenic sites of porcine transmissible gastroenteritis virus involved in immunity. *XI Congreso Nac Microbiol*, 24-27 junio, Gijón (España) **2**: 111-116
52. GARWES DJ, 1988  
Molecular aspects of vaccination with reference to TGE. *Pig Vet Soc Proc*, **20**: 71-80
53. GARWES DJ, STEWART F, CARTWRIGHT SF y BROWN I, 1988  
Differentiation of porcine coronavirus from transmissible gastroenteritis virus. *Vet Rec*, **122**: 86-87
54. GARWES DJ, STEWART F y ELLEMAN CJ, 1987  
Identification of epitopes of immunological importance on the peplomer of porcine transmissible gastroenteritis virus. En: *Advances in experimental medicine and biology*. LAI MMC y STOHLMAN SA (ed.), Plenum Press, N.Y.
55. GOUGH PM, FRANK CJ, MOORE DG, SAGONA MA y JOHNSON DJ, 1983  
Lactogenic immunity to transmissible gastroenteritis virus induced by a subunit immunogen. *Vaccine*, **1**: 37-41
56. HAELTERMAN EO, 1962  
Epidemiological studies of transmissible gastroenteritis of swine. *Proc 66th Ann Meet US Livestock Sanit Assoc*, 305-315
57. HAELTERMAN EO, 1965  
Lactogenic immunity to transmissible gastroenteritis of swine. *J Am Vet Med Assoc*, **147**: 1661
58. HARADA K, FURUUCHI S, KUMAGAI T y SASAHARA J, 1969  
Pathogenicity, immunogenicity and distribution of transmissible gastroenteritis virus in pigs. *Natl Inst Anim Health Q (Tokyo)*, **9**: 185-192
59. HEIDRICH R, MATHEA K y SOBANSKI E, 1987  
Der Verlauf virusbedingter Durchfälle in einer grossen Schweinezucht-und-mastanlage. *Arch Exp Vet-med*, **41**: 885-889
60. HEINRITZI K, PLANK G y EICHHORN W, 1990  
Neue Aspekte im klinischen Verlauf der Coronavirusinfektion der Schweine. *Tierarztl Umschau*, **45**: 39-44
61. HENNING ER y THOMAS PC, 1981  
Comparison of intramuscular and oral modified-live virus TGE vaccines. *Vet Med Small Anim Clin*, **76**: 1789-1792
62. HENNINGSEN D, MOUSING J y AALUND O, 1988  
Porcine corona virus (PCV) i Danmark. En epidemiologisk tværsmitsanalyse baseret på screening-område sporgeskema data. *Dansk Vet-tidssk*, **71**: 1168-1177

63. HILL HT, 1989  
Preventing epizootic TGE from becoming enzootic TGE. *Vet Med*, **84**: 432-436
64. HOHDATSU T, EIGUCHI Y, IDE S, BABA K, YAMAGISHI H, KUME T y MATUMOTO M, 1987  
Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of transmissible gastroenteritis virus antibodies. *Vet Microbiol*, **13**: 93-97
65. HOHDATSU T, EIGUCHI Y, TSUCHIMOTO M, IDE S, YAMAGISHI H y MATUMOTO M, 1987  
Antigenic variation of porcine transmissible gastroenteritis virus detected by monoclonal antibodies. *Vet Microbiol*, **14**: 115-124
66. HOLMES KV, 1990  
Coronaviridae and their replication. En: FIELDS BN, KNIPE DM *et al.* (eds.). *Virology*, pp: 841-856, Raven Press Ltd., N. Y., 2<sup>a</sup> ed.
67. HONDA E, TAKAHASHI H, OKAZAKI K, MINETOMA T y KUMAGAI T, 1990  
The multiplication of transmissible gastroenteritis viruses in several cell lines originated from porcine kidney and effects of trypsin on the growth of the viruses. *Jap J Vet Sci*, **52**: 217-224
68. HOOYBERGHS J, PENSART MB y CALLEBAUT P, 1988  
Transmissible gastroenteritis: outbreaks in swine herds previously infected with a TGE-like porcine respiratory coronavirus. *Proc 10th Congress IPVS*, Rio de Janeiro (Brasil), p. 200
69. IGNATOV G, TUNKARA A y IGNATOVA M, 1987  
[Use of gamma-globulin from peritoneal fluid of cats with feline infectious peritonitis for immunofluorescent demonstration of TGE coronavirus antigen.] *Vet-med Nauki*, **24**: 44-47
70. JACOBS L, GROOT R DE, VAN DER ZEIJST BAM, HORZINEK MC y SPAAN W, 1987  
The nucleotide sequence of the peplomer gene of porcine transmissible gastroenteritis virus (TGEV): comparison with the sequence of the peplomer protein of feline infectious peritonitis virus (FIPV). *Virus Res*, **8**: 363-371
71. JEAN YH, KANG MI, HWANG EK, KWON YB, CHUNG UI y LEE JB, 1987  
[Detection of transmissible gastroenteritis virus in tissue by peroxidase-antiperoxidase method.] *Res Rep Rural Dev Adm (Livestock & Veterinary)*, **29**: 48-53
72. JENSEN MT, KEMENY LJ, STONE SS y RITCHIE AE, 1980  
Direct immunoelectron microscopy of transmissible gastroenteritis virus with immunoglobulins G and A and guinea pig complement. *Am J Vet Res*, **41**: 136-139
73. JESTIN A, LEFORBAN Y y VANNIER P, 1987  
Apparition et prévalence d'un nouveau coronavirus dans les élevages porcins français. *19èmes J Rech Porc France*, Paris (Francia), Institut Technique du Porc: 167-171

74. JESTIN A, LEFORBAN Y y VANNIER P, 1987  
Les coronavirus du porc. *Rec Méd Vét*, **163**: 583-588
75. J-4 JESTIN A, LEFORBAN Y, VANNIER P, MADEC F y GOURREAU JM, 1987  
Un nouveau coronavirus porcin. Études séro-épidémiologiques rétrospectives dans les élevages de Bretagne. *Rec Méd Vét*, **163**: 567-571
76. JIMENEZ G, 1988  
Variabilidad antigénica del virus de la gastroenteritis porcina transmisible. Tesis doctoral. Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid (España).
77. JIMENEZ G, CORREA I, MELGOSA MP, BULLIDO MJ y ENJUANES L, 1986  
Critical epitopes in transmissible gastroenteritis virus neutralization. *J Virol*, **60**: 131-139
78. JIMENEZ G, SUÑE C y ENJUANES L, 1987  
Variabilidad antigénica del virus de la gastroenteritis porcina transmisible. *XI Congreso Mundial Microbiol*, Gijón (España), **1**, (II): 523-524
79. KEMENY LJ, 1978  
Isolation of transmissible gastroenteritis virus from pharyngeal swabs obtained from sows at slaughter. *Am J Vet Res*, **39**: 703-705
80. KEMENY LJ, WILTSEY VL y RILEY JL, 1975  
Upper respiratory infection of lactating sows with transmissible gastroenteritis virus following contact exposure to infected piglets. *Cornell Vet*, **65**: 352-362
81. KEMENY LJ y WOODS RD, 1977  
Quantitative transmissible gastroenteritis virus shedding patterns in lactating sows. *Am J Vet Res*, **38**: 307-310
82. KISH L, 1965  
Survey sampling. Ed. John Wiley & Sons, New York
83. KODAMA Y, OGATA M y SHIMIZU Y, 1980  
Characteristics of immunoglobulin A antibody in serum of swine inoculated with transmissible gastroenteritis virus. *Am J Vet Res*, **40**: 740-745
84. KOMANIWA H, FUKUSHO A y SHIMIZU Y, 1987  
Micro-method for neutralization test of transmissible gastroenteritis virus using porcine kidney cell swine, CPK cells. *Jpn J Vet Sci*, **49**: 141-144
85. KOMANIWA H, MAKABE T, FUKUSHO A y SHIMIZU Y, 1986  
Isolation of transmissible gastroenteritis virus from feces of diarrheic pigs in roller culture of CPK cells in the presence of trypsin. *Jpn J Vet Sci*, **48**: 1245-1248
86. LABADIE JP, AYNAUD JM, RENAULT L, VAISSAIRE J, MAIRE C y DELAHAYE M, 1977  
Gastroentérite transmissible du porcelet: mise en oeuvre du diagnostic au laboratoire. Incidence actuelle du virus dans les élevages. *Rev Méd Vét*, **128**: 455-466

87. LANZA I, 1991  
Epidemiología de las infecciones por el virus de la gastroenteritis transmisible y por el coronavirus respiratorio porcino. Diagnóstico diferencial. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria, Universidad de León (España).
88. LANZA I, BROWN IH y PATON DJ, 1991  
Pathogenicity of concurrent infection in pigs with porcine respiratory coronavirus and swine influenza virus. *Res Vet Sci* (en prensa)
89. LANZA I, RUBIO P y CARMENES P, 1990  
Prevalencia de anticuerpos frente al virus de la gastroenteritis transmisible/coronavirus respiratorio porcino. *Anaporc*, 10: 3-4
90. LANZA I, RUBIO P, ENJUANES L, CALLEBAUT P y CARMENES P, 1990  
Improvement of an ELISA for the detection of IgG anti TGEV/PRCV in swine sera. *Proc 11th Congress IPVS*, Lausanne (Suiza), p. 213
91. LANZA I, RUBIO P, MUÑOZ M, CALLEBAUT P y CARMENES P, 1990  
Epidemiology of TGEV and PRCV infections in Spain. *Proc 11th Congress IPVS*, Lausanne (Suiza), p. 199
92. LARSON DJ, MOREHOUSE LG, SOLORZANO RF y KINDEN DA, 1979  
Transmissible gastroenteritis in neonatal dogs: experimental intestinal infection with transmissible gastroenteritis virus. *Am J Vet Res*, 40: 477-486
93. LAUDE H, CHAPSAL JM, GELFI J, LABIAU S y GROSCLAUDE J, 1986  
Antigenic structure of transmissible gastroenteritis virus. I. Properties of monoclonal antibodies directed against virion proteins. *J Gen Virol*, 67: 119-130
94. LAUDE H, GELFI J, RASSCHAERT D y DELMAS B, 1988  
Caractérisation antigénique du coronavirus respiratoire porcine à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre le virus de la gastro-entérite transmissible. *J Rech. Porc France*, 20: 89-94
95. LAVIADA MD, MARCOTEGUI MA y ESCRIBANO JM, 1988  
Diagnóstico e identificación de un brote de gastroenteritis transmisible porcina en España. *Med Vet (española)*, 5: 563-575
96. MACLACHLAN NJ y ANDERSON KP, 1986  
Effect of recombinant DNA-derived bovine a-1 interferon on transmissible gastroenteritis virus infection in swine. *Am J Vet Res*, 47: 1149-1152
97. MAES RK y HAELTERMAN EO, 1979  
A seroepizootiologic study of five viruses in a swine-evaluation station. *Am J Vet Res*, 40: 1642,1645
98. MAROIS P, DIFRANCO E, BOULAY G y ASSAF R, 1989  
Enzootic pneumonia in feeder pigs: association with transmissible gastroenteritis virus infection. *Can Vet J*, 30: 328-330
99. MATEVA V, 1985  
[Agar gel immunodiffusion test for porcine transmissible gastroenteritis.] *Vet-med Nauki*, 22: 39-44

100. McCLURKIN AW y NORMAN JO, 1966  
Studies on transmissible gastroenteritis of swine. II. Selected characteristics of a cytopathogenic virus common to five isolates from transmissible gastroenteritis. *Can J Comp Med*, 30: 190-198
101. MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACION, SECRETARIA TECNICA (ed.), 1990.  
Manual de Estadística Agraria. Madrid (España)
102. MOTOVSKI A, BELOPOPSKA P, SURTMADZHIEV K, ALEKSIEVA B y ALEKSANDROV M, 1985  
[Detection of transmissible gastroenteritis coronavirus by an immunofluorescent contrast technique.] *Vet-med Nauki*, 22: 9-14
103. MOXLEY RA y OLSON LD, 1989  
Lesions of transmissible gastroenteritis virus infection in experimentally inoculated pigs suckling immunized sows. *Am J Vet Res*, 50: 708-716
104. NELSON LD y KELLING CL, 1984  
Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of transmissible gastroenteritis virus antibody in swine sera. *Am J Vet Res*, 45: 1654-1657
105. NIEUWSTADT AP VAN y BOONSTRA J, 1990  
A competition ELISA to distinguish TGEV- from PRCV-infected pigs. *Proc 11th Congress IPVS*, Lausanne (Suiza), p. 265
106. NIEUWSTADT AP VAN, CORNELISSEN JBWJ y VREESWIJK J, 1988  
Solid phase immune electron microscopy for diagnosis of transmissible gastroenteritis in pigs. *Res Vet Sci*, 44: 286-294
107. NIEUWSTADT AP VAN, CORNELISSEN JBWJ y ZETSTRA T, 1988  
Comparison of two methods for detection of transmissible gastroenteritis virus in feces of pigs with experimentally induced infection. *Am J Vet Res*, 49: 1837-1843
108. NIEUWSTADT AP VAN y POL JMA, 1989  
Isolation of a TGE virus-related respiratory coronavirus causing fatal pneumonia in pigs. *Vet Rec*, 124: 43-44
109. NIEUWSTADT AP VAN, ZETSTRA T y BONNSTRA J, 1989  
Infection with porcine respiratory coronavirus does not fully protect pigs against intestinal transmissible gastroenteritis virus. *Vet Rec*, 125: 58-60
110. O'TOOLE D, BROWN I, BRIDGES A y CARTWRIGHT SF, 1989  
Pathogenicity of experimental infection with "pneumotropic" porcine coronavirus. *Res Vet Sci*, 47: 23-29
111. PATON DJ, 1989  
Transmissible gastroenteritis. En: Manual recommended diagnostic techniques and requirements for biological products for lists A and B diseases (O.I.E.), 1: B53
112. PATON DJ y BROWN IH, 1990  
Sows infected in pregnancy with porcine respiratory coronavirus show no evidence of protecting their sucking piglets against transmissible gastroenteritis. *Vet Res*

113. PATON DJ, BROWN IH y VAZ EK, 1991  
An ELISA for the detection of serum antibodies to both transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus. *Brit Vet J*, 147: 370-372
114. PAUL PS, VAUGHN EM, PUSATERI L, PROESCHOLDT T y ZHU X, 1990  
Investigation of carrier status in transmissible gastroenteritis virus infected pigs. *Proc 11th Congress IPV*, Lausanne (Suiza), p. 207
115. PAUL PS, ZHU XL y VAUGHAN E, 1988  
Current strategies for the development of efficacious vaccines for transmissible gastroenteritis in swine. *Proc US Anim Health Assoc*, 92: 429-443
116. PEDERSEN NC, WARD J y MENGELING WL, 1978  
Antigenic relationship of the feline infectious peritonitis virus to coronaviruses of other species. *Arch Virol*, 58: 43-45
117. PENSAERT MB, 1989  
Porcine epidemic diarrhea virus. En: *Virus infections of porcines*, pp: 167-175. PENSAERT MB (ed.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam
118. PENSAERT MB, 1989  
Transmissible gastroenteritis virus (Respiratory variant). En: *Virus Infections of porcines*, pp: 154-165. PENSAERT MB (ed.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam
119. PENSAERT MB, ANDRIES K y CALLEBAUT P, 1980  
A seroepizootologic study of vomiting and wasting disease virus in pigs. *Vet Q*, 2: 142-148
120. PENSAERT MB, CALLEBAUT P y HOOYBERGHS J, 1987  
Transmissible gastroenteritis virus in swine: old and new. *J Téc Expoaviga-87*, Barcelona (España): 40-45
121. PENSAERT MB, CALLEBAUT P y VERGOTE J, 1986  
Isolation of a porcine respiratory, non-enteric coronavirus related to transmissible gastroenteritis. *Vet. Q*, 8: 257-261
122. PENSAERT MB y COX E, 1989  
A porcine respiratory coronavirus related to transmissible gastroenteritis virus is widespread in Europe. *Agri-Practice*, 10: 17-21
123. PENSAERT MB y DEBOUCK P, 1978  
A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. *Arch Virol*, 58: 243-247
124. PENSAERT MB, DEBOUCK P y REYNOLDS DJ, 1981  
An immunoelectron microscopic and immunofluorescent study on the antigenic relationship between the coronavirus-like agent, CV777, and several coronaviruses. *Arch Virol*, 68: 45-52

125. PLANA J, VAYREDA M y MARULL L, 1982  
Gastroenteritis vírica porcina: diagnóstico de una virosis mortal en el cerdo. *Proc VIIth Int Symp WAVMI*, Barcelona (España), p. 162
126. POSPISCHIL A, COX E y PENSAERT MB, 1990  
Localization of porcine respiratory coronavirus in the small intestine of experimentally infected piglets. *Proc 11th Congress IPVS*, Lausanne (Suiza), p. 219
127. PRITCHARD GC, 1982  
Observations on clinical aspects of transmissible gastroenteritis of pigs in Norfolk and Suffolk, 1980-1981. *Vet Rec*, **110**: 465-469
128. PRITCHARD GC y CARTWRIGHT SF, 1982  
TGE of pigs. *Vet Rec*, **111**: 512
129. RASSCHAERT D, DUARTE M y LAUDE H, 1990  
Porcine respiratory coronavirus differs from transmissible gastroenteritis virus by a few genomic deletions. *J Gen Virol*, **71**: 2599-2607
130. RIERA P, 1989  
Situación actual de la patología infecciosa porcina en España. *X Symp Anaporc*, Barcelona (España), 7: 15
131. RUBIO P, ALVAREZ M y CARMENES P, 1987  
Estudio epizootológico de la GET en Castilla y León (España). *Jornadas técnicas Expoaviga-87*, Barcelona (España): 46-47
132. SAIF LJ y BOHL EH, 1979  
Passive immunity in transmissible gastroenteritis of swine: immunoglobulin classes of milk antibodies after oral-intranasal inoculation of sows with a live low cell culture-passaged virus. *Am J Vet Res*, **40**: 115-117
133. SAIF LJ y BOHL EH, 1986  
Transmissible gastroenteritis. En: *Diseases of swine*, pp: 255-274, 6ª ed. LEMAN AD, et al. (eds.), Iowa State University Press, Ames, Iowa
134. SAIF LJ, BOHL EH, KOHLER EM y HUGHES JH, 1977  
Immune electron microscopy of transmissible gastroenteritis virus and rotavirus (reovirus-like agent) of swine. *Am J Vet Res*, **38**: 13-20
135. SANCHEZ CM, JIMENEZ G, LAVIADA MD, CORREA I, SUÑE C, BULLIDO MJ, GEBAUER F, SMERDOU C, CALLEBAUT P, ESCRIBANO JM y ENJUANES L, 1990  
Antigenic homology among coronaviruses related to transmissible gastroenteritis virus. *Virology*, **174**: 410-417
136. SHIMIZU M y SHIMIZU Y, 1979  
Demonstration of cytotoxic lymphocytes to virus-infected target cells in pigs inoculated with transmissible gastroenteritis virus. *Am J Vet Res*, **40**: 208-213
137. SHOCKLEY LJ, KAPKE PA, LAPPS W, BRIAN DA, POTGIETER LND y WOODS R, 1987  
Diagnosis of porcine and bovine coronavirus infections using cloned cDNA probes.

150. VANNIER P, TILLON JP, AYNAUD JM y MALLORY L, 1977  
Gastro-entérite transmissible du porc: application de la séroneutralisation au diagnostic et à l'épidémiologie de la maladie. *Rec Méd Vét*, 153: 103-108
151. WALLACE LJ y WHITEMAIR CK, 1965  
Influence of porcine transmissible gastroenteritis on chlortetracycline blood levels. *J Am Vet Med Assoc*, 147: 952-956
152. WAXLER GL, 1972  
Lesions of transmissible gastroenteritis in the pig as determined by scanning electron microscopy. *Am J Vet Res*, 33: 1323-1328
153. WESLEY RD, WOODS RD, HILL HT y BIWER JD, 1990  
Evidence for a porcine respiratory coronavirus, antigenically similar to transmissible gastroenteritis virus, in the United States. *J Vet Diagn Invest*, 2: 312-317
154. WISEMAN B, 1989  
Erradicación del TGE sin despoblar. *Int Pigletter*, 9: 5-6
155. WOODS RD, CHEVILLE NF y GALLAGHER JE, 1981  
Lesions in the small intestine of newborn pigs inoculated with porcine, feline, and canine coronaviruses. *Am J Vet Res*, 42: 1163-1169
156. WOODS RD y WESLEY RD, 1986  
Immune response in sows given transmissible gastroenteritis virus or canine coronavirus. *Am J Vet Res*, 47: 1239-1242
157. WOODS RD y WESLEY RD, 1988  
Cultivation techniques for animal coronaviruses: emphasis on feline infectious peritonitis virus, canine coronavirus, transmissible gastroenteritis virus, and porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus. *J Tissue Culture Meth*, 11: 95-100
158. YALING Z, EDERVEEN J, EGBERINK H, PENZAERT MB y HORZINEK MC, 1988  
Porcine epidemic diarrhea virus (CV777) and feline infectious peritonitis virus (FIPV) are antigenically related. *Arch Virol*, 102: 62-71
159. YUS E, LAVIADA MD, MORENO L, CASTRO JM, ESCRIBANO JM y SIMARRO I, 1989  
Prevalencia de anticuerpos frente a virus influenza y coronavirus respiratorio en cerdos de cebo en España. *J Vet Med B*, 36: 551-556

