

## GASTROENTERITIS TRANSMISIBLE

---

### RESUMEN

La gastroenteritis transmisible (GET), es una enfermedad entérica de los cerdos causada por el virus TGEV, que pertenece a los Coronaviridae. Desde 1984 se ha extendido por muchas partes del mundo una variante respiratoria diferente (coronavirus respiratorio porcino o PRCV). Este virus es probablemente un mutante surgido del TGEV por supresión. El PRCV no parece ser un patógeno primario importante, pero incide en el complejo de las enfermedades porcinas y ha complicado mucho el diagnóstico de la GET, sobre todo el diagnóstico serológico.

El diagnóstico de laboratorio se hace demostrando la presencia del virus, de antígenos víricos o de ácidos nucleicos víricos, en muestras de casos sospechosos o mediante la demostración de anticuerpos humorales específicos contra el virus.

**Identificación del agente:** El virus se puede identificar mediante el aislamiento en cultivo de tejidos, por microscopía electrónica, por diversas pruebas inmunológicas de diagnóstico o, más recientemente, por la detección específica del ARN vírico. Las pruebas rápidas más utilizadas son probablemente las de inmunodiagnóstico, en particular las pruebas de enzoinmunoensayo (ELISA) en las heces y las pruebas de inmunofluorescencia sobre secciones de intestino congeladas. Otra enfermedad entérica, la diarrea epidémica porcina, está causada por un coronavirus serológicamente distinto que, sin embargo, tiene una morfología idéntica por microscopía electrónica. A efectos de diagnóstico, la inmunomicroscopía electrónica evita este problema.

**Pruebas serológicas:** Los métodos más utilizados son las pruebas de neutralización y las de tipo ELISA. La diferenciación del PRCV solo es posible por el último procedimiento, ya que los anticuerpos contra TGEV y PRCV muestran una neutralización cruzada completa.

**Requisitos para las vacunas y el material de diagnóstico:** No existen productos disponibles en el ámbito internacional. Sin embargo, varios países practican la vacunación y en EE.UU. se han autorizado licencias para la producción y distribución de vacunas monovalentes y combinadas.

### A. INTRODUCCIÓN

La gastroenteritis transmisible (GET) es una enfermedad entérica de los cerdos causada por el virus de la GET (TGEV), un miembro de la familia *Coronaviridae*. Desde 1984, se ha extendido por muchas partes del mundo, excepto Oceanía, una variante respiratoria distinta (el coronavirus respiratorio porcino o PRCV). La aparición de la GET ha llegado a ser más esporádica. La enfermedad se describe aún ocasionalmente en zonas de Europa, Norteamérica y Asia. El TGEV se multiplica en los enterocitos del intestino delgado y los daña, produciendo atrofia de las vellosidades y enteritis. En los cerdos de cualquier edad se presentan diarreas y vómitos; la mortalidad es más elevada en los neonatos. Los órganos de replicación extra-intestinal de los virus incluyen el tracto respiratorio y los tejidos mamarios (Kemeny *et al.*, 1975), pero el virus se aísla más fácilmente del tracto intestinal y de las heces. Por el contrario, el PRCV se aísla más fácilmente del tracto respiratorio superior, la traquea, las amígdalas o los pulmones, y presenta muy poca multiplicación entérica (Cox *et al.*, 1990; O'Toole *et al.*, 1989; Pensaert *et al.*, 1986). El PRCV puede detectarse mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) en frotis nasales y heces de cerdo infectado por el PRCV (Costantini *et al.*, 2004). El PRCV es probablemente un mutante surgido mediante la supresión del TGEV (Rasschaert *et al.*, 1990), tal como se ha confirmado con datos recientes relativos a la comparación de secuencias completas del genoma 30 KB de cepas del TGEV y el PRCV (Zhang *et al.*, 2007).

Como la GET es una enfermedad contagiosa que puede ocurrir como epizootias explosivas, es muy importante disponer de métodos para su confirmación. La enfermedad también puede adoptar la forma de un problema

endémico menor con diarreas post-destete, que resulta más difícil de diagnosticar. La presencia del TGEV en piaras inmunes también provoca casos clínicos de TGEV más moderados y esporádicos, con lo que se complica el diagnóstico del TGEV en tales escenarios (Kim *et al.*, 2000b).

Se han sugerido como reservorios potenciales del TGEV a los animales domésticos y salvajes. Los carnívoros domésticos y salvajes (zorros, perros y posiblemente visones) y los felinos presentan seroconversión a TGEV y se les señala como portadores subclínicos potenciales del TGEV, convirtiéndose en reservorios entre epidemias estacionales (invierno). No obstante, solo se han confirmado como infecciosos para los cerdos los virus excretados por los perros infectados de forma continuada con TGEV (Saif & Sestak, 2006). Sobre la base de similitudes genéticas y antigénicas, se ha propuesto que el TGEV, el PRCV, y los coronavirus felinos y caninos representan mutantes de un coronavirus ancestral que se hallan en varios hospedadores. Se ha señalado a los pájaros silvestres (*Sturnus vulgaris*) y las moscas (*Musca domestica*) como vectores mecánicos del TGEV, que excretan el virus durante 32 y 72 horas respectivamente (Saif & Sestak, 2006).

## B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

### 1. Identificación del agente

El virus se puede identificar mediante el aislamiento en cultivo de tejidos (Dulac *et al.*, 1977), la inmunofluorescencia, la hemagutinación pasiva inversa, el ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA), el radioinmunoensayo (RIA), la hibridación con sondas de ADN, la microscopía electrónica, y, más recientemente, por la detección específica del ARN vírico (Enjuanes & Van der Zeijst, 1995; Kim *et al.*, 2000a; Paton *et al.*, 1997; Saif & Sestak, 2006; Sirinarumitr *et al.*, 1996; Woods, 1997). En los últimos años las técnicas moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) y la RT-PCR anidada, han aumentado la sensibilidad y la especificidad de la detección y la diferenciación entre TGEV y PRCV directamente en muestras de campo (Costantini *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2000a; 2000b; Paton *et al.*, 1997). Un método alternativo de diagnóstico, que se recomienda para los laboratorios que carecen de medios para las pruebas especializadas, es el suministro por vía oral del contenido intestinal de una animal sospechoso a los lechones susceptibles y seronegativos para TGEV/PRCV. Sin embargo, es necesario realizar pruebas de laboratorio para confirmar la susceptibilidad de los cerdos antes de la inoculación y para demostrar que cualquier enfermedad inducida en estos animales se debe a la GET. Los ensayos rápidos más utilizados son probablemente los del inmunodiagnóstico, en particular los ensayos de inmunoadsorción enzimática (ELISA) con heces (Bernard *et al.*, 1986; Lanza *et al.*, 1995; Van Nieuwstadt *et al.*, 1988b) y las pruebas de inmunofluorescencia (FAT) sobre secciones de intestino congeladas (Pensaert *et al.*, 1968) y la inmunohistoquímica (IHQ) sobre secciones en parafina y fijadas con formalina (Shoup *et al.*, 1996). También se ha descrito la detección de virus por hemaglutinación pasiva inversa (Asagi *et al.*, 1986). Otra enfermedad entérica, la diarrea epidémica porcina (DEP), está causada por un coronavirus serológicamente distinto, que, sin embargo, tiene una morfología idéntica por microscopía electrónica. A efectos de diagnóstico, la inmunomicroscopía electrónica evita este problema (Saif *et al.*, 1977; Van Nieuwstadt *et al.*, 1988a), lo que también se consigue mediante la aplicación de pruebas de detección específicas para el virus PED (Kim *et al.*, 2001).

#### 1.1. Aislamiento del virus en cultivo de tejidos

Independientemente de la inoculación de lechones vivos (Dulac *et al.*, 1977), este es el método de diagnóstico más seguro. Sin embargo, para el uso rutinario, es lento y laborioso. El TGEV no crece bien en cultivo celular, lo que hace que esta técnica sea poco práctica como procedimiento diagnóstico rutinario. Es más, el aislamiento del TGEV en cerdos de las piaras seronegativas para PRCV también es problemático y a menudo es preciso introducir cerdos seronegativos para TGEV/PRCV en la pira sospechosa para que actúen como centinelas, procediéndose a continuación a la recogida de muestras de esos centinelas para el aislamiento y la detección del TGEV (Costantini *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2000b). El PRCV puede aislarse en cultivo celular utilizando los mismos tipos de células y técnicas que para el TGEV, si bien señalaremos como especímenes óptimos las células o fluidos nasales y los tejidos u homogeneizados de traquea, amígdala o pulmón (Costantini *et al.*, 2004; Pensaert *et al.*, 1986).

En el caso del TGEV, normalmente, se intenta el aislamiento ante-mórtem a partir de las heces, o post-mórtem del intestino delgado. Las muestras preferidas son las asas del intestino delgado afectado, atadas en cada extremo para retener su contenido o un frotis de mucosa de la superficie del lumen del intestino delgado. Como el virus es sensible al calor, todas las muestras deben mantenerse frescas o congeladas.

El material de la muestra se homogeneiza hasta producir una suspensión al 10% con medio de cultivo celular o con solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,2, que contenga antibióticos, como penicilina (1.000 U/ml), dihidroestreptomocina (1.000 U/ml), y micostatín (20 U/ml). La suspensión se

deja reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos sin recibir la luz solar directa. A continuación se sonica y se clarifica mediante centrifugación a baja velocidad. El sobrenadante se puede mezclar con el mismo volumen de suero bovino inactivado por calor, para reducir el efecto citotóxico del material, y se utiliza luego para inocular cultivos de tejidos susceptibles, como monocapas de 3 o 4 días de células primarias o secundarias de riñón de cerdo. También pueden utilizarse para el aislamiento primario del virus otros cultivos porcinos de pocos pases (de tiroides o de testículos) y algunas líneas celulares (Honda *et al.*, 1990; McClurkin & Norman, 1966). Después de incubar a 37°C durante 1 hora, las monocapas se recubren con un medio, como la solución salina equilibrada de Earle con levadura y lactoalbúmina (EYL), que contiene bicarbonato sódico y antibióticos, como penicilina (100 U/ml), dihidroestreptomina (100 U/ml), micostatin (20 U/ml), y 1% de suero fetal bovino. La incorporación de tripsina al medio de cultivo puede facilitar el aislamiento primario del virus (Bohl, 1979; Honda *et al.*, 1990). Se realizan en paralelo cultivos control no inoculados y se incuban todos a 37°C.

A los 3 o 7 días se puede observar el efecto citopático (ECP), caracterizado por un redondeamiento y agrandamiento celular, la formación de sincitios y la liberación al medio. La formación de placas o calvas es a veces más fácil de reconocer. Un medio de cobertura adecuado para las placas es agar noble al 1.6% en medio mínimo esencial 2x con 1% de NaCO<sub>3</sub>, antibióticos (como antes), rojo neutro al 0,7% y 1% de DEAE (dietilaminoetil) (100 µg/ml). Las cepas de TGEV de campo no crecen fácilmente en cultivo de tejidos, por lo que pueden necesitarse varios pases antes de que se manifiesten estos cambios. Los aislamientos con ECP deben confirmarse como TGEV por inmunomarcaje o por neutralización *in vitro* utilizando antisueros específicos contra el TGEV (Bohl, 1979). Si se dispone de anticuerpos monoclonales (MAbs), se pueden utilizar para distinguir entre el TGEV y el PRCV por técnicas de inmunomarcaje (Garwes *et al.*, 1988; Simkins *et al.*, 1992). La diferenciación entre el TGEV y el PRCV también puede realizarse con sondas de cADN específicas de TGEV (Bae *et al.*, 1991) o por la RT-PCR discriminante o la RT-PCR anidada (Costantini *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2000a; 2000b; Paton *et al.*, 1997).

## 1.2. Prueba de anticuerpo fluorescente para antígenos víricos

La prueba de inmunofluorescencia es un método rápido, sensible y específico para identificar antígenos víricos del TGEV en secciones de intestino congeladas. Se necesita un cerdo recién fallecido y el animal ideal debe tener menos de 4 semanas (preferiblemente, menos de 1 semana) y en el inicio de los síntomas clínicos de la enfermedad (es decir, a las 24–48 horas de la infección). Dentro de los 30 minutos post mórtem, se toman porciones de 2 cm de cuatro regiones diferentes de la parte posterior del intestino delgado. De estas porciones se cortan trozos de 5–10 mm y se congelan instantáneamente con nieve carbónica. Es importante la orientación correcta del material para asegurar que el posterior corte en el criostato produzca secciones realmente transversales. Se cortan secciones de 6 µm de grosor, se montan en cubres, se secan al aire y se fijan en acetona. Un procedimiento alternativo y más rápido consiste en cortar y abrir en sentido longitudinal un trozo del intestino delgado distal, lavar la superficie mucosa con PBS y preparar frotis a partir de la superficie del lumen intestinal sobre portas limpiados con etanol, secados al aire y fijados con acetona (Bohl, 1979). A continuación se procesan y tiñen los portas como las secciones de criostato de la siguiente forma. Se guardan a –20°C secciones o frotis de controles positivos y negativos para su tinción en paralelo. Después de lavar con tampón Tris, pH 8,7, o con PBS, las secciones se tiñen con una solución diluida de anticuerpo contra el TGEV conjugado con isotiocianato de fluoresceína, y se colocan en un incubador con humedad a 37°C durante 30 minutos. El marcaje no unido se elimina lavando con tampón Tris. Si se desea, se puede realizar una tinción de contraste con una dilución 10<sup>-5</sup> de azul de Evans en tampón Tris y se montan con glicerol.

Las secciones o frotis teñidos se examinan de inmediato con un microscopio de luz ultravioleta. La calidad de la tinción se determina por comparación con los controles. Una interpretación correcta depende del grado de conservación de la integridad de las vellosidades, cuyas células epiteliales se examinan para fluorescencia intracitoplasmática.

Recientemente se ha desarrollado un método de IHQ con peroxidasa-antiperoxidasa para la demostración del TGEV mediante la detección del TGEV y el PRCV en muestras congeladas fijadas con formalina, y en tejidos incluidos en parafina (Jean *et al.*, 1987; Shoup *et al.*, 1996). La IHQ aplicada a los tejidos fijados con formalina es ventajosa porque puede realizarse de forma prospectiva o retrospectiva con los mismos tejidos fijados con formalina que se usan para la histopatología, y los tejidos o portas fijados pueden transportarse más fácilmente ya que son estables y no contienen virus vivos (Shoup *et al.*, 1996).

### 1.3. Detección de antígenos víricos en muestras fecales mediante el enzoinmunoensayo

Se puede utilizar un sistema “sándwich” de doble anticuerpo, por ejemplo con un MAb de captura y un anticuerpo policlonal detector unido a un enzima (Lanza *et al.*, 1995; Sestak *et al.*, 1996). Esta prueba se basa en la captura del antígeno vírico en la muestra fecal por tres MAb, dos específicos para la proteína S (sitio A y D) y uno para la nucleoproteína N (Lanza *et al.*, 1995; Sestak *et al.*, 1996). Como control de especificidad de la prueba se utiliza un recubrimiento negativo que consiste en anticuerpos purificados del líquido ascítico de ratones inoculados con células de mieloma SP2/0 que no reconocen al TGEV. Los MAb se depositan en microplacas de 96 pocillos en tampón bicarbonato, pH 9,6, y se incuban a 37°C toda la noche. Todas las muestras se prueban en pocillos duplicados, uno con recubrimiento positivo (los MAb contra el TGEV) y otro con el recubrimiento negativo. Las muestras fecales se diluyen en un medio para cultivo celular (1/10), se agitan en vórtex y se centrifugan a baja velocidad (2.000 *g*) durante 15 minutos. Después se decanta el sobrenadante en tubos estériles y se prueba o se guarda congelado. Las placas se lavan dos veces con tampón de lavado (PBS con 0,05% de Tween 20) antes de añadir las muestras fecales preparadas. Las placas se incuban a 37°C toda la noche. Se lavan cuatro veces y se añade suero anti-TGEV policlonal marcado con biotina en PBS con 0,05% de Tween 20. Las placas se incuban a 37°C durante 1 hora y después se lavan cuatro veces antes de añadir estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano, y se incuban a 37°C durante 1 hora. Se lavan las placas seis veces antes de añadir el substrato enzimático, que es ABTS (2,2'-azino-di [3-etil-benzotiazolina]-6-ácido sulfónico) con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,03% en tampón citrato, pH 4,2. La reacción se detiene en los 30 minutos a temperatura ambiente añadiendo dodecil sulfato sódico al 5%. La absorbancia se determina con un lector para ELISA a 405 nm. En cada placa se incluyen muestras fecales positivas y negativas para el TGEV.

### 1.4. Métodos para el reconocimiento de los ácidos nucleicos víricos

Para la detección directa del TGEV en muestras clínicas se han descrito métodos de hibridación *in situ* (ISH) y de RT-PCR, que permiten la diferenciación del PRCV (Kim *et al.*, 2000a; Paton *et al.*, 1997; Sirinarumit *et al.*, 1996). Una segunda prueba de PCR anidada puede aumentar significativamente la sensibilidad (Costantini *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2000a; 2000b; Paton *et al.*, 1998). La diferenciación entre los virus de la GET se puede realizar analizando los productos de la PCR con endonucleasas de restricción (Woods, 1997) o por secuenciación (Costantini *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2000b; McGoldrick *et al.*, 1999; Paton & Lowings, 1997; Zhang *et al.*, 2007). Se ha descrito una RT-PCR doble para la detección combinada del TGEV y del virus de la diarrea epidémica porcina (Kim *et al.*, 2001).

## 2. Pruebas serológicas

La serología puede ser de valor diagnóstico si se demuestra un aumento en el título de anticuerpos. Además, un único resultado seropositivo tiene valor diagnóstico si se presenta en una población previamente seronegativa. Las pruebas serológicas son también una pre-condición para la importación, ya que la posibilidad de adquirir cerdos portadores se puede reducir aceptando solo animales seronegativos.

Después de la infección con el TGEV o el PRCV, los anticuerpos específicos se pueden detectar en el suero a los 6 o 7 días, y persisten durante varios meses. Aunque los anticuerpos contra el PRCV o el TGEV muestran entre sí una neutralización cruzada completa, hay diferencias en la especificidad de alguno de los anticuerpos no neutralizantes (Callebaut *et al.*, 1988; Enjuanes & Van der Zeijst, 1995; Garwes *et al.*, 1988; Saif & Sestak, 2006; Simkins *et al.*, 1992), ya que el PRCV carece de algunos epitopos presentes en el TGEV. Sin embargo, la neutralización vírica (NV) no es un método práctico para diferenciar la infección por el PRCV de la del TGEV. Se pueden incorporar MAb contra tales regiones en pruebas de ELISA por competición para detectar anticuerpos séricos que sean por completo específicos para el TGEV. Aunque tales pruebas son fiables porque no producen resultados de positivos falsos con antisueros PRCV, pueden darse negativos falsos debido a una sensibilidad reducida en comparación con las pruebas de neutralización, y debido a variaciones de las cepas del virus de la GET, de modo que ningún MAb único y específico para el TGEV puede reconocer todas las cepas (Brown & Paton, 1991; Simkins *et al.*, 1992). El problema de la falta de sensibilidad puede reducirse realizando las pruebas sobre un grupo de cerdos de la explotación. Estas pruebas ELISA basadas en los MAb son el método de elección para diferenciar el PRCV del TGEV en la cualificación de animales para la exportación.

Utilizando estas pruebas de diagnóstico diferencial antes de las 3 semanas siguientes a la exposición al PRCV, también se han producido resultados poco repetitivos y poco fiables (Sestak *et al.*, 1999b). Los resultados más seguros se obtuvieron probando sueros pareados (de animales en fase aguda de la enfermedad y de convalecientes) y utilizando la proteína recombinante de las espículas (S) del TGEV como antígeno en lugar de células fijadas de testículo de cerdo infectadas por TGEV (Sestak *et al.*, 1999b).

## 2.1. Pruebas para el virus de la gastroenteritis/coronavirus respiratorio porcino

Estas pruebas detectan anticuerpos comunes al TGEV y al PCRV, e incluyen pruebas de NV, ensayos de tipo ELISA indirectos (Hohdatsu *et al.*, 1987; Huang *et al.*, 1988; Liu *et al.*, 2001; McGoldrick *et al.*, 1999; Rukhadze *et al.*, 1989) y ELISA competitivos basados en MAb contra TGEV/PCRV específicos de grupo (Paton *et al.*, 1991).

Las pruebas de NV se pueden realizar con varios tipos de células y de cepas de virus. Las líneas celulares más frecuentemente utilizadas son las de testículo de cerdo (McClurkin & Norman, 1966) o células primarias o continuas de riñón de cerdo. Estas pruebas se han utilizado mucho durante muchos años y se consideran como estándar, frente a las cuales se comparan pruebas nuevas. Es frecuente la utilización de una prueba de NV para reducción de placas en la que se utilizan monocapas de células testiculares de cerdo en placas de plástico de 6 pocillos y la cepa Purdue del TGEV (Bohl, 1979). En el método modificado de Witte (Witte, 1971), que se describe más adelante, se utilizan placas de microtitulación para el cultivo de tejidos con fondo plano, la línea celular A72 que procede de un tumor rectal de perro, y una cepa natural de virus adaptado a crecer en dichas células: se incuban 100 DICT<sub>50</sub> (dosis infectiva del 50% en cultivo de tejidos) de virus con los sueros problema inactivados por calor, y la neutralización se aprecia por la ausencia del ECP después de la incubación posterior con células A72 en medio Leibovitz 13 (Sigma, Reino Unido) con antibióticos incorporados, 10% de suero fetal bovino y 1% de L-glutamina. El volumen total de los reactivos es de 150 µl.

### 2.1.1. Neutralización del virus: procedimiento de la prueba

- i) Los sueros se inactivan durante 30 minutos en un baño a 56°C.
- ii) Se hacen diluciones dobles de los sueros problema con medio de cultivo de células, empezando con suero no diluido (este da una dilución de 1/2 cuando se mezcla con un volumen igual de virus en la reacción). Las diluciones se preparan en placas de microtitulación para cultivo de tejidos con 96 pocillos de fondo plano, usando, si es posible, tres pocillos por dilución y volúmenes de 25 µl por pocillo. En la prueba también se incluyen controles con sueros positivos y negativos. No hay sueros estándar disponibles, pero deben prepararse estándares internos positivos y titularse adecuadamente.
- iii) A cada pocillo se añaden 25 µl de una dilución del stock de TGEV en medio de cultivo, calculada para proporcionar 100 DICT<sub>50</sub> por pocillo. El virus se debe añadir a dos de los tres pocillos de cada dilución de suero. El tercer pocillo sirve como control de suero solo, y recibirá 25 µl de medio de cultivo por pocillo en vez de virus.
- iv) El virus residual se vuelve a titular haciendo cuatro diluciones decimales y utilizando 25 µl por pocillo y, por lo menos, cuatro pocillos por dilución; a cada uno de los pocillos de titulación se añaden 25 µl de medio de cultivo para compensar por la ausencia de suero problema.
- v) Se agitan brevemente las placas y se incuban después durante 1 hora a 37°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>.
- vi) A cada pocillo se añaden 100 µl de células, por ejemplo de una suspensión de células A72 con 2 x 10<sup>5</sup> células por mililitro.
- vii) Se incuban las placas durante 3–7 días a 37°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>; la prueba se puede realizar igualmente bien si las placas se incuban sin CO<sub>2</sub>.
- viii) Se analizan las placas al microscopio para el ECP. La técnica se valida comprobando la titulación del virus (que debería dar un valor de 100 DICT<sub>50</sub> con un rango permitido entre 50–200 DICT<sub>50</sub>) y la de los sueros control. El suero estándar positivo debería dar un valor dentro de 0.3 unidades log<sub>10</sub> a cada lado de su media predeterminada. Las lecturas de cada dilución de suero problema deben hacerse por comparación con el control apropiado de suero solo para diferenciar el ECP vírico de la citotoxicidad inducida por el suero o por contaminación.
- ix) Los resultados del suero problema se determinan por el método de Spearman–Kärber como la dilución de suero que neutraliza el virus en el 50% de los pocillos.
- x) Un suero negativo no debe producir neutralización a la menor dilución probada (es decir, suero sin diluir, equivalente a una dilución de 1/2 en la técnica de neutralización).

## 2.2. Pruebas específicas del virus de la gastroenteritis transmisible para diferenciar cerdos infectados por el TGEV de los infectados por el PRCV

Las pruebas específicas para el TGEV son técnicas ELISA de bloqueo o de competición que utilizan un MAb que reconoce el TGEV pero no el PRCV (Brown & Paton, 1991; Callebaut *et al.*, 1989; Sestak *et al.*, 1999b; Simkins *et al.*, 1992; Van Nieuwstadt & Boonstra, 1991) y son las idóneas para calificar a los animales para la exportación. Los sueros de cerdos infectados previamente con una cepa de TGEV reconocida por el MAb contendrán anticuerpos de la misma especificidad que pueden competir con él para unirse al antígeno del TGEV en placas de ELISA recubiertas con tal antígeno. Los cerdos infectados por el PRCV que carezca del único epítipo del TGEV no producirán anticuerpos específicos contra ese epítipo; de ahí que los anticuerpos para PRCV no competirán ni bloquearán la unión de los MAb específicos para el TGEV (Brown & Paton, 1991; Callebaut *et al.*, 1989; Sestak *et al.*, 1999b; Simkins *et al.*, 1992; Van Nieuwstadt & Boonstra, 1991). Los antígenos para ELISA se pueden preparar a partir de lisados de líneas celulares de riñón inoculadas con cepas de TGEV adaptadas a cultivo de tejidos o no infectadas. Alternativamente, se han usado como fuente de antígeno células de testículo de cerdo, infectadas o no infectadas con TGEV, y fijadas con acetona al 80%. También se pueden preparar antígenos de la proteína recombinante S (rec-S) recogida en forma soluble de una línea celular de insecto (Sf9) infectada con un baculovirus recombinante que expresa una proteína S del TGEV que contiene los cuatro antígenos principales (Sestak *et al.*, 1999b; Simkins *et al.*, 1992). Se fijan los antígenos positivos y los negativos a filas alternativas de placas de microtitulación con tampón bicarbonato, pH 9,6. Los sueros problema diluidos, incluyendo los controles positivos para el TGEV conocidos y los negativos para TGEV/PRCV conocidos, así como los positivos para el PRCV conocidos (negativos en esta prueba, positivos en la prueba de NV) se añaden a pocillos adecuados y se incuban durante la noche antes de la adición a todos los pocillos de MAb diluido. El MAb unido se detecta por un anticuerpo anti-ratón conjugado con peroxidasa que produce una reacción coloreada en presencia del substrato apropiado. Los cambios de color se miden en un espectrofotómetro y para cada suero problema el resultado neto es el que resulta de la diferencia en absorbancias entre el pocillo con antígeno positivo y con antígeno negativo, y que se expresa como el porcentaje del resultado obtenido con el suero control negativo. El valor de corte entre negativo y positivo en la prueba se debe determinar con un ensayo previo de poblaciones negativas y positivas conocidas. Existen varias preparaciones comerciales, que son específicas para el TGEV.

Las pruebas descritas hasta la fecha, basadas en la hemaglutinación (Labadie *et al.*, 1977; Noda *et al.*, 1987; Shimizu & Shimizu, 1977) se validaron antes de la aparición del PRCV. Sin embargo, pueden ser específicas para el TGEV, ya que el TGEV, pero no el PRCV, es hemaglutinante (Schultze *et al.*, 1996).

## C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS Y EL MATERIAL DE DIAGNÓSTICO

Son varios los países donde se vacuna contra la GET.

Las directrices para la producción de vacunas veterinarias se presentan en el capítulo 1.1.8. *Principios de producción de vacunas veterinarias*. Las indicaciones dadas aquí y en el capítulo 1.1.8. son de carácter genérico y pueden completarse con los requisitos nacionales y regionales.

Se ha revisado la información sobre el trabajo experimental y los ensayos de campo con vacunas contra el TGEV autorizadas en EE.UU., incluyendo sus posibles limitaciones de eficacia en condiciones de campo y conceptos relacionados con el diseño de optimización de vacunas contra el TGEV (Saif, 1993; Saif & Jackwood, 1990; Saif & Sestak, 2006). En EE.UU. hay varios fabricantes autorizados para producir vacunas contra el TGEV: las vacunas pueden ser vivas modificadas e inactivadas. Las vacunas vivas modificadas se administran oralmente a cerdas gestantes (para inducir la inmunidad pasiva) y se han autorizado también para administración oral a lechones (para inducir la inmunidad activa). Las vacunas inactivadas se han autorizado para la inoculación parenteral de cerdas gestantes por vía intramuscular o intraperitoneal a los lechones. En general, estas vacunas inducen una protección pasiva marginal contra la infección inducida por el TGEV de desafío en lechones lactantes cuando se evalúan bajo condiciones experimentales controladas o en el campo en piaras afectadas por TGEV/PRCV. Aunque no proporcionan una protección adecuada contra la GET epizootica, los datos sugieren que estas vacunas pueden poseer alguna eficacia contra el TGEV enzoótico estimulando una respuesta anamnésica de anticuerpos contra el TGEV en el suero y en la leche (Saif & Jackwood, 1990; Saif & Sestak, 2006).

La principal razón sugerida para explicar el fracaso de las vacunas contra el TGEV es su incapacidad para estimular la producción de altos niveles de anticuerpos del tipo de IgA secretoria (SIgA) en la leche, análogos a los anticuerpos SIgA que se encuentran en la leche de las cerdas seronegativas infectadas de modo natural con el TGEV (Saif & Jackwood, 1990; Saif & Sestak, 2006). Además, estas vacunas no protegen adecuadamente a

las cerdas contra la EGT, de modo que esta enfermedad ocasiona a menudo en las cerdas anorexia, agalaxia e incapacidad para proteger pasivamente a las crías. Dado que las vacunas vivas modificadas pueden fallar porque el virus no se replica suficientemente en el intestino para inducir la inmunidad protectora o cuando se suministran a animales seronegativos recién nacidos, existe una preocupación respecto a la posibilidad de su reversión a la forma virulenta. Las vacunas inactivadas por vía parenteral no inducen anticuerpos SIgA; las respuestas inmunes mediadas por células son a menudo pobres y la duración de la inmunidad suele ser muy corta. Aunque se ha propuesto el uso de vacunas con PRCV para la GET, los estudios experimentales sobre su eficacia contra el TGEV han mostrado falta de eficacia (Paton & Brown, 1990) o solo una protección cruzada parcial (Bernard *et al.*, 1989; Cox *et al.*, 1993; Van Cott *et al.*, 1994). Sin embargo, la amplia prevalencia de las infecciones por PRCV en la población porcina europea, parece haber reducido notablemente la incidencia de la GET epizootica en Europa (Pensaert *et al.*, 1986). Las nuevas estrategias con ADN recombinante para el desarrollo de vacunas contra el TGEV contemplan la posible utilización de una vacuna con subunidades a base de la proteína S (dependiente del desarrollo de sistemas de liberación en las mucosas y de adyuvantes) (Park *et al.*, 1998; Sestak *et al.*, 1999a; Shoup *et al.*, 1997) o la utilización de vectores vivos víricos o bacterianos recombinantes que expresen genes del TGEV que sean importantes en la inducción de la inmunidad (Enjuanes *et al.*, 2001; Saif, 1993; Saif & Sestak, 2006; Smerdou *et al.*, 1996; Torres *et al.*, 1996; Yount *et al.*, 2000).

Todos los productos biológicos, incluyendo a las vacunas, han de cumplir varios requisitos generales (como su producción en servicios autorizados, reglas de marca, capacidad de seguimiento, etc.). Existen distintas regulaciones (denominadas requisitos estándares o SR) que describen las pruebas a las que se deben someter las vacunas y las materias primas. En el Código de Regulaciones Federales (CFR) Título 9, Volumen 1, Parte 113 (abreviado más adelante como 9 CFR, 113) (United States Department of Agriculture [USDA], 1995) contiene una información detallada sobre los SR para las vacunas en EE.UU. Las directrices del monográfico sobre la Farmacopea Europea General y de la EMEA (Agencia Europea de Medicamentos) son aplicables para las vacunas contra el TGEV, aunque actualmente no se use ninguna vacuna en la Unión Europea.

## 1. Control del inóculo

### 1.1. Características del inóculo

El virus de inóculo debe probarse para verificar su pureza e identidad. La pureza incluye la ausencia de bacterias y hongos (9 CRF 113:27), micoplasmas (9 CRF 113:28) y de virus indeseables (9 CRF 113:55) (USDA, 1995). La demostración de la identidad se suele realizar por NV o FAT. Las vacunas producidas por ingeniería genética o las seleccionadas naturalmente, para las que se supone que el gen que codifica al antígeno ha sido suprimido o inactivado, deben aportar evidencia (genotípica y/o fenotípica) de tal hecho.

### 1.2. Método de cultivo

El cultivo debe hacerse sobre células (aprobadas) que no estén contaminadas y con un número de pases en cultivo limitado (por lo general, a cinco). No se requiere que la especie de origen de la línea celular sea porcina.

### 1.3. Validación como vacuna

La validación de la vacuna tiene dos formas. El inóculo original se considera inmunogénico si una vacuna hecha con el pase más alto, y de acuerdo con un diseño de producción, resulta protectora. El nivel antigénico más bajo (título del virus vivo modificado o masa de antígeno inactivado) que sea protector constituye la línea base para todos los futuros lotes seriados del producto. En el caso de productos vivos, se deben añadir los factores de variación en la titulación y la curva de muerte con el tiempo. Se comprobarán la pureza, inocuidad y eficacia de estas vacunas por parte del fabricante. Se debe demostrar protección frente a la enfermedad natural con el virus virulento de desafío. Este se define como la dosis que causa la enfermedad en  $\geq 95\%$  de los controles susceptibles. Después se deben realizar y probar por el fabricante y por la autoridad competente tres series de pre-autorización en cuanto a la potencia, la esterilidad y la inocuidad.

## 2. Método de fabricación

Esta información es propiedad de cada fabricante y por lo tanto no está disponible.

## 3. Control interno

Esta es una información en gran medida privada. Algunos controles internos se refieren directamente a la producción (por ejemplo, concentración de O<sub>2</sub> en el fermentador). Sin embargo, otros comprenden pruebas

similares a la prueba de la potencia final en los recipientes. En todas las vacunas, cuanto más simple sea la prueba de potencia del lote final o del recipiente, más probable resulta su utilización como una prueba de control: por ejemplo, la titulación del virus en lotes parciales permite predecir la calidad del título del lote final. Los ingredientes de origen animal deben esterilizarse o estar libres de contaminación.

#### **4. Control de lotes**

Los lotes deben adaptarse a las especificaciones finales y a las del envasado (por ejemplo, se pueden mezclar varias fermentaciones, o se puede dividir una y mezclarla con otras tres, etc.). En algunos países, el control de producción y el del proceso definen el producto y están sujetos a una regulación y escrutinio estrictos. En EE.UU. se hace énfasis en el producto final. Las técnicas de control de lotes deben detallarse en las normas de producción y deben tener sentido y permitir el seguimiento. El productor debe descartar cualquier producto que no cumpla con las especificaciones. Si se va a exportar un lote a otro país para envasado o normalización, entonces está sujeto a todas las pruebas como si fuera el producto final.

##### **4.1. Esterilidad**

Todos los productos deben probarse para verificar su esterilidad. El productor también puede llevar a cabo pruebas de esterilidad como control sobre los lotes. Las pruebas son similares a las descritas en la sección C.1.1.

##### **4.2. Inocuidad**

Las pruebas de inocuidad se realizan antes de conceder la licencia, y sobre el recipiente final (secciones C.5.1. y C.5.2.).

##### **4.3. Potencia**

Normalmente la potencia se determina solamente si la prueba de potencia es simple (por ejemplo, ELISA) para confirmar los cálculos de normalización antes del envasado.

##### **4.4. Duración de la inmunidad**

La duración de la inmunidad se prueba en los ensayos en serie de pre-licencia (eficacia), no en el control de lotes. Se requieren nuevos productos para apoyar las indicaciones de los prospectos en cuanto a la cronología de las revacunaciones con ensayos de eficacia (desafío) en el momento especificado después de la vacunación.

##### **4.5. Estabilidad**

La estabilidad se establece antes de la concesión de la autorización. Normalmente se utiliza el envejecimiento acelerado (37°C) para estimar la caducidad, de modo que los productos no tengan que mantenerse a la temperatura de conservación (4°C) por el período real de tiempo. Esto se puede confirmar después con datos de tiempo real. No es necesario que el productor realice pruebas de estabilidad. Se exige que los productores definan la cantidad de material antigénico presente en sus productos durante todo el período de validez. Se seleccionan muestras del producto (normalmente vivo) y se prueban dentro de los 30 días previos a la fecha de expiración para ver, por ejemplo, si el título se encuentra al nivel indicado por el productor. La estabilidad también está afectada por la humedad. La humedad residual dejada en un producto desecado puede acortar su vida, de modo que esto debe probarse en el producto final o durante el control interno del proceso.

##### **4.6. Conservantes**

Hay restricciones sobre la cantidad máxima de antibióticos que puede contener un producto. Las restricciones en algunos componentes de la vacuna se relacionan con su inocuidad y con la cuestión de si el período considerado es lo bastante largo como para que el componente se haya eliminado antes del sacrificio del animal. Los conservantes usados son confidenciales.

##### **4.7. Precauciones (riesgos)**

Cualquier riesgo derivado de la vacunación debe manifestarse claramente en el prospecto. Normalmente esto está en relación con las advertencias sobre la gestación y el aborto que pueden ocasionar los virus vivos, y con problemas generales de anafilaxia, pero también pueden advertir al



usuario en sobre la aparición de dolor o inflamación en el punto de inoculación o, en algunos casos, de fiebre transitoria o inapetencia. No existen precauciones fuera de lo corriente para las vacunas contra el GET autorizadas en la actualidad.

## 5. Pruebas sobre el producto final

### 5.1. Inocuidad

Por lo general se trata de una prueba de inocuidad sobre ratón y/o cobaya o en cerdos (9 CFR 113:33 y Witte, 1971). Las pruebas de esterilidad también se realizan sobre el producto final.

### 5.2. Potencia

No hay una prueba única para la potencia. Cualquier prueba que se utilice debe de correlacionarse con la protección en el animal hospedador (las pruebas de eficacia). La potencia de las vacunas con TGEV vivo se pueden evaluar por la titulación *in vitro* de la dosis vírica infecciosa en cultivo celular (Saif, 1993). Este título debe correlacionarse con el título mínimo de virus necesario para inducir la inmunidad de protección frente a una infección experimental y también frente a una infección natural en condiciones de campo. La potencia de las vacunas muertas se determina por vacunación y pruebas de desafío, utilizando dosis diferentes de vacuna. Se pueden aceptar los títulos de anticuerpos neutralizantes inducidos por inoculación de la vacuna en animales de laboratorio si existe una correlación establecida con el desarrollo de la inmunidad de protección.

En las vacunas inactivadas se pueden cuantificar los antígenos víricos particulares con la inducción de anticuerpos neutralizantes y con la protección frente a un desafío utilizando MAb específicos en ensayos de ELISA, como los MAb neutralizantes contra la proteína S del TGEV (Saif, 1993).

## REFERENCIAS

ASAGI M., OGAWA T., MINETOMA T., SATO K. & INABA Y. (1986). Detection of transmissible gastroenteritis virus in feces from pigs by reversed passive haemagglutination. *Am. J. Vet. Res.*, **47**, 2161–2164.

BAE I., JACKWOOD D.J., BENFIELD D.A., SAIF L.J., WESLEY R.D. & 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.

BERNARD S., BOTTREAU E., AYNAUD, J.M., HAVE P. & SZYMANSKY J. (1989). Natural infection with the porcine respiratory coronavirus induces protective lactogenic immunity against transmissible gastroenteritis virus. *Vet. Microbiol.*, **21**, 1–8.

BERNARD S., LANTIER I., LAUDE H. & AYNAUD J.M. (1986). Detection of transmissible gastroenteritis coronavirus antigens by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay technique. *Am. J. Vet. Res.*, **47**, 2441–2444.

BOHL E.H. (1979). Diagnosis of diarrhea in pigs due to transmissible gastroenteritis or rotavirus. *In: Viral Enteritis in Humans and Animals*, Bricout F. & Scherrer R., eds. INSERM, Paris, France, **90**, 341–343.

BROWN I.H. & PATON D.J. (1991). Serological studies of transmissible gastroenteritis in Great Britain, using a competitive ELISA. *Vet. Rec.*, **128**, 500–503.

CALLEBAUT P., CORREA I., PENSART M., JIMENEZ G. & ENJUANES L. (1988). Antigenic differentiation between transmissible gastroenteritis virus of swine and a related porcine respiratory coronavirus. *J. Gen. Virol.*, **69**, 1725–1730.

CALLEBAUT P., PENSART M.B. & 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.

COSTANTINI V., LEWIS P., ALSOP J., TEMPLETON C. & SAIF L.J. (2004). Respiratory and enteric shedding of porcine respiratory coronavirus (PRCV) in sentinel weaned pigs and sequence of the partial S gene of the PRCV isolates. *Arch. Virol.*, **149**, 957–974.

COX E., HOOYBERGHS J. & PENSART M.B. (1990). Sites of replication of a porcine respiratory coronavirus related to transmissible gastroenteritis virus. *Res. Vet. Sci.*, **48**, 165–169.

- COX E., PENZAERT M.B. & CALLEBAUT P. (1993). Intestinal protection against challenge with transmissible gastroenteritis virus of pigs after infection with the porcine respiratory coronavirus. *Vaccine*, **11**, 267–272.
- DULAC G.C., RUCKERBAUER G.M. & 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.
- ENJUANES L., SOLA I., ALMAZAN F., ORTEGO J., IZETA A., GONZALEZ J.M., ALONSO S., SANCHEZ J.M., ESCORS D., CALVO E., RIQUELME C. & SANCHEZ C. (2001) Coronavirus derived expression systems. *J. Biotechnol.*, **88**, 183–204.
- ENJUANES L. & VAN DER ZEIJST B.A.M (1995). Molecular basis of transmissible gastroenteritis virus epidemiology. *In: The Coronaviridae*, Siddell, Stuart G., ed. Plenum Press, New York, USA, 337–376.
- GARWES D.J., STEWART F., CARTWRIGHT S.F. & BROWN I. (1988). Differentiation of porcine respiratory coronavirus from transmissible gastroenteritis virus. *Vet. Rec.*, **122**, 86–87.
- HOHDATSU T., EIGUCHI Y., IDE S., BABA H. & YAMAGISHI H. (1987). Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of transmissible gastroenteritis virus antibodies. *Vet. Microbiol.*, **13**, 93–97.
- HONDA E., TAKAHASHI H., OKAZAKI K., MINETOMA T. & 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. *Jpn J. Vet. Sci.*, **52**, 217–224.
- HUANG C-C., JONG M.H. & LAI S.Y. (1988). Preparation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit and its application in diagnosis of transmissible gastroenteritis. *Taiwan J. Vet. Med. Anim. Husbandry*, **51**, 57–63.
- JEAN Y.H., KANG M.I., HWANG E.K., KWON Y.B., CHUNG U.I. & LEE J.B. (1987). Detection of transmissible gastroenteritis virus in tissue by peroxidase–antiperoxidase method. Research Reports Rural Development Administration (Livestock & Veterinary), Korea, **29**, 48–53.
- KEMENY L.J., WILTSEY V.L. & RILEY J.L. (1975). Upper respiratory infection of lactating sows with transmissible gastroenteritis virus following contact exposure to infected piglets. *Cornell Vet.*, **65**, 352–362.
- KIM L., CHANG K.O., SESTAK K., PARWANI A & SAIF L.J. (2000a). Development of a reverse transcription-nested polymerase chain reaction assay for differential diagnosis of transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus from feces and nasal swabs of infected pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **12**, 385–388.
- KIM L., HAYES J., LEWIS P., PARWANI A.V., CHANG K.O. & SAIF L.J. (2000b). Molecular characterization and pathogenesis of transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) and porcine respiratory coronavirus (PRCV) field isolates co-circulating in a swine herd. *Arch. Virol.*, **145**, 1133–1147.
- KIM S.Y., SONG D.S. & PARK B.K. (2001). Differential detection of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus by duplex RT-PCR. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **13**, 516–520.
- LABADIE J.P., AYNAUD J.M., VAISAIRE J. & RENAULT L. (1977). Porcine transmissible gastroenteritis. Antibody detection by passive haemagglutination test: applications to diagnosis and epidemiology. *Rec. Med. Vet.*, **153**, 931–936.
- LANZA I., SHOUP D.I. & SAIF L.J. (1995). Lactogenic immunity and milk antibody isotypes to transmissible gastroenteritis virus in sows exposed to porcine respiratory coronavirus during pregnancy. *Am. J. Vet. Res.*, **56**, 739–748.
- LIU C., KOKUHO T., KUBOTA T., WATANABE S., INUMARU S., YOKOMIZO Y. & ONODERA T. (2001). A serodiagnostic ELISA using recombinant antigen of swine transmissible gastroenteritis virus nucleoprotein. *J. Vet. Med. Sci.*, **63**, 1253–1256.
- MCCLURKIN A.W. & NORMAN J.O. (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.
- MCGOLDRICK A., LOWINGS J.P. & PATON D.J. (1999). Characterization of a recent virulent transmissible gastroenteritis virus from Britain with a deleted ORF 3a. *Arch. Virol.*, **144**, 763–770.
- NELSON L.D. & KEHLING C.L. (1984). Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of transmissible gastroenteritis virus antibody in swine sera. *Am. J. Vet. Res.*, **45**, 1645–1657.
- NODA M., YAMASHITA H., ICOIDE F., KODOI K., ORNON T., ASAGI M. & INABA Y. (1987). Haemagglutination with transmissible gastroenteritis. *Arch. Virol.*, **96**, 109–115.

- O'TOOLE D., BROWN I.H., BRIDGES A. & CARTWRIGHT S.F. (1989). Pathogenicity of experimental infection with 'pneumotropic' porcine coronavirus. *Res. Vet. Sci.*, **47**, 23–29.
- PARK S., SESTAK K., HODGINS D.C., SHOUP D.I., WARD L.A., JACKWOOD D.J. & SAIF L.J. (1998). Immune response of sows vaccinated with attenuated transmissible gastroenteritis virus (TGEV) and recombinant TGEV spike protein vaccine and protection of their suckling piglets against virulent TGEV challenge. *Am. J. Vet. Res.*, **59**, 1002–1008.
- PATON D.J. & BROWN I.H. (1990). Sows infected in pregnancy with porcine respiratory coronavirus show no evidence of protecting their suckling piglets against transmissible gastroenteritis. *Vet. Res. Commun.*, **14**, 329.
- PATON D.J., BROWN I.H. & VAZ E.K. (1991). An ELISA for the detection of serum antibodies to both transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus. *Br. Vet. J.*, **147**, 370–372.
- PATON D.J., IBATA G., MCGOLDRICK A., JONES T.O. & PRITCHARD G.C. (1998). Attempted isolation and characterisation of recent British isolates of transmissible gastroenteritis. Proceedings of the 15<sup>th</sup> IPVS Congress, Birmingham, UK, 5–9 July 1998.
- PATON D., IBATA G., SANDS J. & MCGOLDRICK A. (1997). Detection of transmissible gastroenteritis virus by RT-PCR and differentiation from porcine respiratory coronavirus. *J. Virol. Methods*, **66**, 303–309.
- PATON D. & LOWINGS P. (1997). Discrimination between transmissible gastroenteritis virus isolates. *Arch. Virol.*, **142**, 1703–1711.
- PENSAERT M., CALLEBAUT P. & VERGOTE J. (1986). Isolation of a porcine respiratory, non-enteric coronavirus related to transmissible gastroenteritis. *Vet. Q.*, **8**, 257–261.
- PENSAERT M.B., HALTERMAN E.O. & BERNSTEIN T. (1968). Diagnosis of transmissible gastroenteritis in pigs by means of immunofluorescence. *Can. J. Comp. Med.*, **32**, 555–561.
- RASSCHAERT D., DUARTE M. & LAUDE H. (1990). Porcine respiratory coronavirus differs from transmissible gastroenteritis virus by a few genomic deletions. *J. Gen. Virol.*, **71**, 2599–2607.
- RUKHADZE G.G., ALIPER T.I. & SERGEEV V.A. (1989). Isolation of peplomer glycoprotein E2 of transmissible gastroenteritis virus and application in enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, **27**, 1754–1758.
- SAIF L.J. (1993). Coronavirus immunogens. *Vet. Microbiol.*, **37**, 285–297.
- SAIF L.J., BOHL E.H., KOHLER E.M. & HUGHES J.H. (1977). Immune electron microscopy of transmissible gastroenteritis virus and rotavirus (reovirus-like agent) of swine. *Am. J. Vet. Res.*, **38**, 13–20.
- SAIF L.J. & JACKWOOD D.J. (1990). Enteric virus vaccines: Theoretical considerations, current status and future approaches. *In: Viral Diarrheas of Man and Animals*, Saif L.J. & Theil K.W., eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 313–329.
- SAIF L.J. & SESTAK K. (2006). Transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus. *In: Diseases of Swine*, Ninth Edition, B.E.Straw *et al.*, eds. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA, 489–516.
- SCHULTZE B., KREMPLE C., BALLESTEROS M.L., SHAW L., SCHAUER R., ENJUANES L. & HERRLER G. (1996). Transmissible gastroenteritis coronavirus, but the related porcine respiratory coronavirus, has a sialic acid (N-glycolylneuramic acid) binding activity. *J. Virol.*, **70**, 5634–5637.
- SESTAK K., LANZA I., PARK S.K., WEILNAU P. & SAIF L.J. (1996). Contribution of passive immunity to porcine respiratory coronavirus to protection against transmissible gastroenteritis virus challenge exposure in suckling pigs. *Am. J. Vet. Res.*, **5**, 664–671.
- SESTAK K., MEISTER R.K., HAYES J.R., KIM L., LEWIS P.A., MYERS G. & SAIF L.J. (1999a). Active immunity and T-cell populations in pigs intraperitoneally inoculated with baculovirus-expressed transmissible gastroenteritis virus structural proteins. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **70**, 203–221.
- SESTAK K., ZHOU Z., SHOUP D.I. & SAIF L.J. (1999b). Evaluation of the baculovirus-expressed S glycoprotein of transmissible gastroenteritis virus (TGEV) as antigen in a competition ELISA to differentiate porcine respiratory coronavirus from TGEV antibodies in pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **11**, 205–214.
- SHIMIZU M. & SHIMIZU Y. (1977). Micro-indirect haemagglutination test for detection of antibody against transmissible gastroenteritis virus of pigs. *J. Clin. Microbiol.*, **6**, 91–95.

- SHOUP D., JACKWOOD D.J. & SAIF L.J. (1997). Active and passive immune responses to transmissible gastroenteritis virus (TGEV) in swine inoculated with recombinant baculovirus-expressed TGEV spike glycoprotein vaccines. *Am J. Vet. Res.*, **58**, 242–250.
- SHOUP D.I., SWAYNE D.E., JACKWOOD D.J. & SAIF L.J. (1996). Immunohistochemistry of transmissible gastroenteritis virus antigens in fixed paraffin-embedded tissues. *J. Vet. Diagn Invest.*, **8**, 161–167.
- SIMKINS R.A., WEILNAU P.A., BIAS J. & SAIF L.J. (1992). Antigenic variation among transmissible gastroenteritis virus (TGEV) and porcine respiratory coronavirus strains detected with monoclonal antibodies to the S protein of TGEV. *Am. J. Vet Res.*, **53**, 1253–1258.
- SIRINARUMITR T., PAUL P.S., KLUGE J.P. & HALBUR P.G. (1996). *In situ* hybridization technique for the detection of swine enteric and respiratory coronaviruses, transmissible gastroenteritis virus (TGEV) and porcine respiratory coronavirus (PRCV), in formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *J. Virol. Methods*, **56**, 149–160.
- SMERDOU C., URNIZA A., CURTIS III R. & ENJUANES L. (1996). Characterization of transmissible gastroenteritis coronavirus S protein expression products in avirulent *S. typhimurium* mitDeltacya mitDeltacr3: persistence, stability and immune response in swine. *Vet. Microbiol.*, **48**, 87–100.
- TORRES J.M., COVADONGA A., ORTEGA A., MITTAL S., GRAHAM F. & ENJUANES L. (1996). Tropism of human adenovirus type 5-based vectors in swine and their ability to protect against transmissible gastroenteritis coronavirus. *J. Virol.*, **70**, 3770–3780.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA) (1995). Code Of Federal Regulations, Title 9, Parts 1–199. US Government Printing Office, Washington D.C., USA.
- VAN COTT J., BRIM T., LUNNEY J. & SAIF L.J. (1994). Contribution of antibody secreting cells induced in mucosal lymphoid tissues of pigs inoculated with respiratory or enteric strains of coronavirus to immunity against enteric coronavirus challenge. *J. Immunol.*, **152**, 3980–3990.
- VAN NIEUWSTADT A.P. & BOONSTRA J. (1991). A competitive ELISA to distinguish TGEV- from PRCV-infected pigs. International Pig Veterinary Society Proceedings 1990, 265.
- VAN NIEUWSTADT A.P., CORNELISSEN J.B. & VREESWIJK J. (1988a). Solid phase immune electron microscopy for diagnosis of transmissible gastroenteritis in pigs. *Res. Vet. Sci.*, **44**, 286–294.
- VAN NIEUWSTADT A.P., CORNELISSEN J.B. & ZETSTRA T. (1988b). Comparison of two methods for detection of transmissible gastroenteritis virus in feces of pigs with experimentally induced infection. *Am. J. Vet. Res.*, **49**, 1836–1843.
- WITTE K.H. (1971). Micro-colour test for assay of transmissible gastroenteritis virus neutralizing antibodies. *Arch. Gesamte Virusforsch.*, **33**, 171–176.
- WOODS R.D. (1997). Development of PCR-based techniques to identify porcine transmissible gastroenteritis coronavirus isolates. *Can. J. Vet. Res.*, **61**, 167–172.
- YOUNT B., CURTIS K. & BARIC R. (2000). Strategy for systematic assembly of large RNA and DNA genomes: Transmissible gastroenteritis virus model. *J. Virol.*, **74**, 10600–10611.
- ZHANG X., HASOKSUZ M., SPIRO D., HALPIN R., WANG S., STOLLAR S., JANIES D., HADYA N., TANG Y., GHEDIN E. & SAIF L.J. (2007). Complete genomic sequences, a key residue in the spike protein and deletions in non-structural protein 3b of US strains of the virulent and attenuated coronaviruses, transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus. *Virology*, **358**, 424–435.

\*

\* \*

**NB:** En el momento (2021) no existían Laboratorios de Referencia de la OIE para la septicemia hemorrágica (puede consultarse la página web de la OIE:

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

**NB:** ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1989. ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2008.