

## Short Communication

*Dpto. Patología Animal I, Facultad Veterinaria y Dpto. de Sanidad Animal  
Inst. Nac. Invest. Agrarias (INIA), Madrid*

### Prevalencia de Anticuerpos Frente a Virus Influenza y Coronavirus Respiratorio en Cerdos de Cebo en España

E. YUS<sup>1</sup>, M. D. LAVIADA<sup>2</sup>, L. MORENO<sup>2</sup>, J. M. CASTRO<sup>2</sup>, J. M. ESCRIBANO<sup>2</sup>  
y I. SIMARRO<sup>1</sup>

Dirección de los autores: Correspondencia I. SIMARRO

<sup>1</sup>Dpto. Patología Animal I (Patología Infecciosa), Facultad de Veterinaria,  
Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid.

<sup>2</sup>Dpto. de Sanidad Animal, INIA, C/Embajadores 68, 28012 Madrid

*Con 3 figuras y 1 tabla*

*(Recibido el 22 de Febrero 1989)*

#### Summary

#### The prevalence of antibodies to influenza and respiratory coronaviruses among fattening pigs in Spain

The presence of antibodies to two influenza viruses of the type A (H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> and H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) and to a porcine respiratory coronavirus was investigated in a study lasting a year. 735 blood serum samples were collected from 79 closed pig fattening farms in the province Segovia (Spain). Hemagglutination inhibition was used with influenza viruses. The percentage of positive results was 78.5 % and 62.5 % respectively for the serotypes H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> and H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>. A clear reduction in the spread of antibodies was observed in the autumn.

The ELISA technique was used with the porcine respiratory coronavirus. As antigen we used the antigenically related transmissible porcine gastroenteritis virus. Using this technique 87 % of the sera were positive. Some of these sera with representative ELISA values were confirmed by means of serum neutralisation and radioimmune precipitation of the viral proteins. The incidence of these antibodies remained unchanged over the whole year of the investigation.

**Key words:** Prevalence of antibodies, influenza, H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> pig, H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> human, respiratory coronavirus

#### Introducción

La Influenza porcina es una enfermedad respiratoria bien conocida, ya descrita en USA desde 1918. En Europa los primeros casos de comunicaron en 1976 (1), correspondiendo a serotipos H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>. El primer aislamiento de virus H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> de origen humano a partir de ganado porcino se realizó en Taiwan (2) y posteriormente en Europa (3). En España los primeros brotes surgieron en 1981 (4) identificándose como agente causal a un virus H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>. Sin embargo ya en 1986 se estableció la presencia de ambos serotipos (5, 6) como causantes de focos clínicos en la provincia de Segovia. Si la Influenza porcina es un

trastorno estacional (7) hay que admitir que una gran parte de las infecciones son subclínicas. Nosotros hemos querido establecer la prevalencia de anticuerpos (AC) y comprobar la circulación de los dos serotipos a lo largo de un año en ganado de cebo. El estudio se ha realizado en una zona de alta concentración de porcino, formando parte este, de otro en preparación más amplio geográficamente y realizado frente a 9 serotipos diferentes.

En cuanto al coronavirus respiratorio porcino, recientemente aislado (8) (VCRP), se trata de un virus estrechamente relacionado, desde el punto de vista antigénico, al virus de la Gastroenteritis porcina transmisible (GPT), como se ha establecido muy recientemente (9). En varios países europeos se ha comprobado una elevada prevalencia de anticuerpos frente al virus de la GPT en ausencia de enfermedad clínica (9), lo que sugirió la posibilidad de la existencia de otro virus antigénicamente relacionado. Una vez aislado este e infectados experimentalmente animales, se ha visto que no produce trastorno entérico, pero si elevadas cifras de AC que neutralizan totalmente al virus de la GPT (9). La GPT ha sido puesta de manifiesto en España en dos ocasiones (10, 11).

En el presente trabajo hemos querido comprobar la presencia de AC específicos frente al VGPT en granjas que no han padecido procesos diarreicos, atribuibles a esta enfermedad. Por tanto dichos AC se deberían presumiblemente a la presencia de VCRP, como ha sido comprobado en otras áreas europeas.

### Material y Métodos

*Sueros.* Se obtuvieron en matadero 735 sueros a partir de cerdos de cebo, procedentes de 79 granjas de ciclo cerrado situadas en la provincia de Segovia. Los sueros fueron recogidos a lo largo del año 1987 y distribuidos estacionalmente. Durante este tiempo algunas granjas presentaron brotes clínicos de Influenza, pero no de GPT. Una vez centrifugados se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

*Virus.* Se utilizaron dos cepas de virus influenza tipo A: Belgica/1/83 ( $\text{H}_1\text{N}_1$ )\* y Gante/1/87 ( $\text{H}_3\text{N}_2$ )\*. Los virus se produjeron por pases en embrión de pollo de 9 días de edad.

La cepa Purdue de VGPT en su pase 112 en células ST (testículo porcino), se empleó para la detección de AC frente al VCRP, dada su reactividad antigénica cruzada.

#### *Técnicas Serológicas*

*Inhibición de la Hemoaglutinación (IHA).* Esta técnica se llevó a cabo siguiendo procedimientos descritos anteriormente (12) para detectar AC específicos frente a virus influenza. Para eliminar inhibidores no específicos, los sueros se trataron con «receptor destroying enzyme» (RDE, Sigma C-8772) y se absorbieron durante 1 h a  $4^{\circ}\text{C}$  con una suspensión de hematies de pollo al 50 %. Se consideraron específicamente positivos títulos de 1/80 o superiores. Los sueros control se produjeron en conejo (4 inoculaciones i. v. con intervalo de 7 días, con título aproximado de virus 1/5000 HA, purificado en gradiente de sacarosa 10/40 % P/V).

*ELISA.* La cepa Purdue se purificó en gradiente de sacarosa (13) y se fijó a las pacas a una concentración de  $0,4 \mu\text{g}$  proteína/pocillo durante una noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . Los sueros se emplearon diluidos a 1/30, revelándose los inmunocomplejos mediante proteína A-peroxidasa y O-Phenylenediamine (OPD, Sigma P-6662). Los sueros con valores de absorbancia por encima de 0,5 a 496 nm se consideraron como positivos.

*Radioinmunoprecipitación de Proteínas Antigénicas.* Extractos celulares de células ST infectadas con VGPT y marcadas metabólicamente con metionina- $\text{S}^{35}$  ( $100 \mu\text{Ci/ml}$ ), se inmunoprecipitaron con sueros (representativos de diferentes valores de ELISA) siguiendo una metodología ya descrita (14). Los inmunocomplejos absorbidos se analizaron mediante electroforesis en geles de poli(acrilamida)-SDS (14).

*Seroneutralización.* Los sueros fueron titulados en placas microtiter por dilución límite capaz de neutralizar 100  $\text{DI}_{50}$  de VGPT (15). El ensayo de neutralización fué leído a las 72 h determinando la presencia de efecto citopático en cada pocillo.

\* Proporcionadas por el Dr. PENSAERT. Fact. Vet. Gante, Belgica.

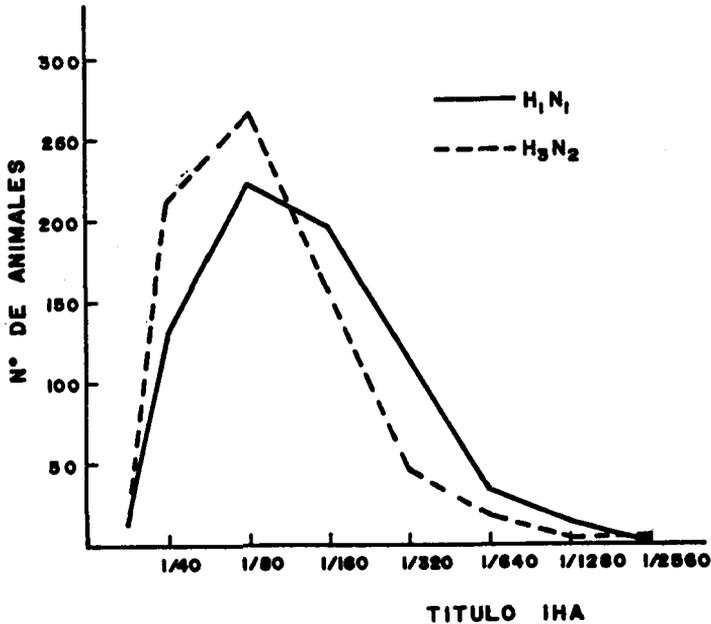


Fig. 1. Representación del valor de inhibición de la hemoaglutinación (IHA) de 735 sueros testados frente a los serotipos de virus influenza H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> y H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>. Los sueros se absorbieron durante 1 h at 4 °C con una suspensión de hematíes de pollo al 50 %, después de haber eliminado inhibidores no específicos

### Resultados

Los resultados obtenidos en el estudio serológico frente a las dos cepas de virus Influenza H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> y H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> se presentan en la Fig. 1, siendo los porcentajes de positivos respectivamente del 78,5 % y del 62,5 %. La población encuestada mostró una mayor frecuencia de títulos de IHA de 1/40 a 1/320 para H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> y de 1/40 a 1/160 para H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>.

En la Fig. 2 se representan los resultados obtenidos por ELISA frente al VGPT. El porcentaje total de positivos fue del 87 %. Algunos sueros con valores representativos mediante la citada técnica fueron confirmados por seroneutralización e inmunoprecipitación (Fig. 3).

La distribución de positivos según las estaciones del año puede observarse en la Tabla 1. La prevalencia de AC fue muy elevada frente a todos los virus. En el caso de los Influenza se observó un claro descenso durante el otoño. Los AC frente al VGPT se mantuvieron constantes a lo largo de todas las estaciones.

### Discusión

La presencia de infección por virus influenza en la población encuestada queda perfectamente confirmada dada la elevada cifra de animales seropositivos. Probablemente estos resultados están influidos porque se trata de lotes procedentes de granjas de ciclo cerrado y además por la alta concentración porcina de esta provincia (la tercera productora española), todo lo cual favorece la circulación de los diferentes virus.

La clara disminución de la prevalencia observada durante los meses de otoño para ambos serotipos, concuerda con los ciclos epidemiológicos clásicos de Influenza porcina (7). En este modelo establecido, los brotes aparecen en otoño, invierno y comienzos de primavera. Así, podemos correlacionar el descenso de AC con la aparición subsiguiente de trastornos respiratorios. Sin embargo, HAESBROUCK y col. (16) en 1986 encontraron cifras muy semejantes de AC tanto en mayo (primavera) como en octubre (otoño) frente a los dos

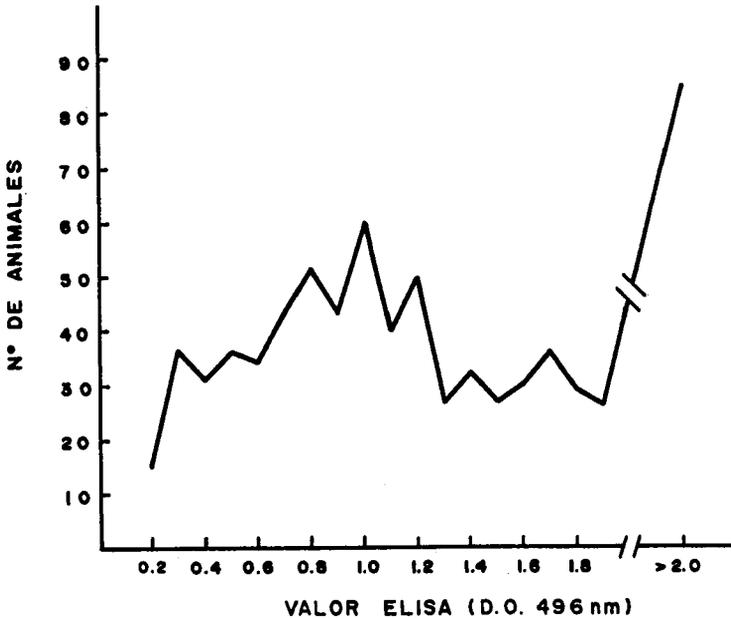


Fig. 2. Representación del valor ELISA de 735 sueros testados para anticuerpos frente al VCRP. La técnica se realizó utilizando VGPT purificado a una concentración de 0,4 µg/pocillo. Los inmunocomplejos fueron revelados mediante conjugado de proteína A-peroxidasa

serotipos de virus influenza. El resultado encontrado por nosotros en verano-otoño posiblemente indique que las infecciones permanecen circulando subclínicamente.

La alta incidencia de AC anti VGPT presentes en los sueros estudiados, y teniendo en cuenta que las granjas de procedencia de los animales no han padecido episodio diarreico alguno en los últimos años, hace suponer que estos AC son debidos a la presencia del VCRP antigénicamente relacionado. Este fenómeno de alta incidencia de AC frente al VGPT ha sido descrito por otros autores (9). Mediante técnicas de inmunoprecipitación, seroneutralización ó ELISA ambos virus son por el momento indiferenciables, teniendo que recurrir a ensayos de competición antigénica mediante AC monoclonales para su diferenciación (9).

### Zusammenfassung

#### Prävalenz der Antikörper gegen die Influenza- und respiratorischen Coronaviren bei Mastschweinen in Spanien

Im Laufe eines Jahres wurde eine Untersuchung über die Präsenz von Antikörpern gegen zwei Influenzaviren Typ A ( $H_1N_1$  und  $H_3N_2$ ) und ein porcines respiratorisches Coronavirus angefertigt. In 79 Schweinemastbetrieben mit geschlossenem Zyklus in der Provinz Segovia (Spanien) wurden 735 Blutserumproben entnommen. Für die Influenzaviren wurde die Hämagglutinationshemmungstechnik angewendet. Der Positivenprozentsatz lag bei 78,5 % bzw. 62,5 % für die Serotypen  $H_1N_1$  und  $H_3N_2$ . Während des Herbstes wurde eine klare Abnahme der Antikörperverbreitung gegen beide Serotypen festgestellt.

Für das porcine respiratorische Coronavirus wurde die ELISA-Technik angewendet. Als Antigen setzten wir das antigenisch verwandte Virus der transmissiblen porcinen Gastroenteritis ein. Bei dieser Technik waren 87 % der Seren positiv. Einige dieser Seren mit repräsentativen ELISA-Werten wurden mittels Serumneutralisation und Radioimmunpräzipitation der viralen Proteine bestätigt. Die Inzidenz dieser Antikörper blieb unveränderlich über das ganze Jahr hindurch bestehen.

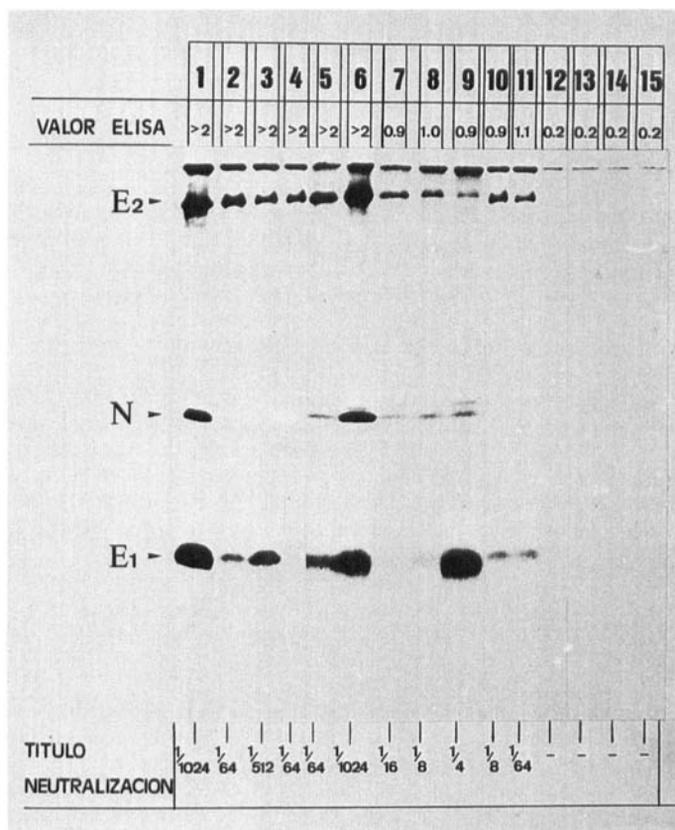


Fig. 3. Radioinmunoprecipitación de proteínas del VGPT por diferentes sueros con valores de ELISA significativos frente a este virus. Los títulos de seroneutralización de estos sueros, mediante dilución límite capaz de neutralizar 100 DI<sub>50</sub>, se indican en la parte inferior de la figura

### Resumen

Se ha realizado, a lo largo de un año, un estudio sobre la presencia de anticuerpos frente a dos virus Influenza tipo A (H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> y H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) y un coronavirus respiratorio porcino. El muestreo se realizó sobre 735 sueros de cerdo pertenecientes a 79 granjas de ciclo cerrado de la provincia de Segovia (España). Para los virus Influenza se utilizó la técnica de inhibición de la hemoaglutinación. El porcentaje de positivos fue del 78,5 % y 62,5 % para los serotipos H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> y H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>, respectivamente. Se observó una clara disminución de la prevalencia de anticuerpos frente a ambos en otoño.

Para el coronavirus respiratorio porcino se usó la técnica ELISA. Como antígeno se utilizó virus de la gastroenteritis transmisible porcina, antigénicamente relacionado. Un 87 % de los sueros resultaron positivos a esta técnica. Algunos de estos sueros con valores ELISA representativos fueron

Tabla 1. Distribución de positivos según las estaciones del año

Año 1987	Nº. Sueros	Nº. positivos/porcentajes		
		H <sub>1</sub> N <sub>1</sub>	H <sub>3</sub> N <sub>2</sub>	VGPT
Primavera	226	208 (92 %)	181 (80 %)	197 (87,2 %)
Verano	176	144 (81,8 %)	131 (74,4 %)	157 (89,2 %)
Otoño	206	155 (55,8 %)	60 (29,1 %)	167 (81 %)
Invierno	127	110 (86,6 %)	88 (69,3 %)	117 (92 %)

confirmados mediante seroneutralización y radioinmunoprecipitación de proteínas virales. La incidencia de estos anticuerpos permaneció invariable a lo largo de todo el año.

### Referencias

1. NARDELLI, L., S. PACUCCI, G. R. GUALANDI, and P. LODA, 1978: Outbreaks of classical swine influenza in Italy in 1976. *Zentralb. Veterinärmed. B* 853—857.
2. KUNDIN, W. D., 1970: Hong Kong A-2 influenza virus infection among swine during a human epidemic in Taiwan. *Nature* 228, 857.
3. OTTIS, K., L. SIDOLI, P. A. BACHMANN, R. G. WEBSTER, and M. M. KAPLAN, 1982: Human influenza A viruses in pigs: isolation of a H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> strain antigenically related to A/England/42/72 and evidence for continuous circulation of human viruses in the pig population. *Arch. Virol.* 73, 103—108.
4. PLANA, J., M. VAYREDA, X. VILA, and I. MARULL, 1984: Isolation for the first time in Spain of swine influenza virus. *Proc. I. P. V. S. Ghent, Belgium* 62.
5. CASTRO, J. M., M. DEL POZO, R. NOVAL, J. DE MIGUEL, M. GIL, J. L. COMENDADOR y I. SIMARRO, 1987: Trastornos respiratorios de forma epizootica en España por virus influenza H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> y H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>. *Med. Vet.* 4 (1), 17—24.
6. CASTRO, J. M., M. DEL POZO, and I. SIMARRO, 1988: Identification of H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> influenza virus isolated from pigs with respiratory problems in Spain. *Vet. Record* 122, 418—419.
7. EASTERDAY, B. C., 1986: Swine influenza, in *Diseases of swine*, 6a ed. por LEMAN, A. D., B. STRAW, R. D. GLOCK et al. Iowa University Press, Ames Iowa, USA.
8. PENSART, M., P. CALLEBAUT, and J. VERGOTE, 1986: Isolation of a porcine respiratory nonenteric coronavirus related to Transmissible Gastroenteritis. *Vet. Quarterly* 8, 257—261.
9. CALLEBAUT, P., I. CORREA, M. PENSART, G. JIMENEZ, and L. ENJUANES, 1988: Antigenic differentiation between Transmissible Gastroenteritis virus of swine and a related porcine respiratory coronavirus. *J. Gen. Virol.* 69, 1725—1730.
10. PLANA, J., M. VAYREDA y L. MARULL, 1982: Gastroenteritis virica porcina: diagnóstico serológico de una virosis mortal en el cerdo. VII Int. Symp. of W. A. V. M. I. Barcelona, España.
11. LAVIADA, M. D., M. A. MARCOTEGUI y J. M. ESCRIBANO, 1988: Diagnóstico e identificación de un brote de Gastroenteritis transmisibile porcina en España. *Med. Vet.* 5 (11), 563—575.
12. PALMER, D. F., M. T. COLEMAN, W. R. DOWDLE, and G. C. SCHILD, 1975: Advanced laboratory techniques for influenza diagnosis. US Dep. of Health, Education and Welfare. Immunology series no. 6.
13. BRIAN, D. A., D. E. DENNIS, and J. S. GUY, 1980: Genome of porcine transmissible gastroenteritis virus. *J. Virol.* 34, 410—415.
14. ESCRIBANO, J. M., and E. TABARÉS, 1987: Proteins specified by African swine fever virus: V. Identification of immediate early, early and late proteins. *Arch. Virol.* 92, 221—232.
15. HSIUNG, G. D., and C. K. FONG, 1982: *Diagnostic Virology*. Yale University Press. New Haven and London.
16. HAESBROUCK, F., and M. PENSART, 1986: Prevalence of H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> and H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> influenza A viruses in fatteners in Belgium (1984). *Vlaams Diergeneesk. Tijds.* 55 (1), 12—16.