

Prevalencia serológica del virus de influenza A en cerdos en Argentina durante la temporada 2002: Evaluación mediante inhibición de la hemaglutinación y ELISA

P. E. PIÑEYRO^{1,2*}, E. BAUMEISTER³, J. A. CAPPUCCIO¹, M. A. MACHUCA¹, M. A. QUIROGA¹, T. TEDOROFF³, C. J. PERFUMO¹

¹Catedra de Patología Especial, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, CC 296. (1900) La Plata, Argentina; ²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) Argentina;

³Servicio de Virus Respiratorios, INEI-ANLIS Dr. Carlos Malbrán.

Av. Vélez Sársfield 563 (1281) Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

*Correspondencia. E-mail: pineyropablo@vetmed.wsu.edu

RESUMEN

Se evaluó la prevalencia serológica del virus de influenza mediante las pruebas de inhibición de la hemaglutinación (IHA) y ELISA para los subtipos H1N1 y H3N2 en 13 granjas porcinas de Argentina. Se compararon los resultados obtenidos mediante ambas pruebas en términos individuales y de establecimientos. La prevalencia individual por la técnica de IHA fue de 38,46% a 100% para H1 y de 7,69% a 100% para H3. Por la técnica de ELISA, la prevalencia individual fue de 2,33% a 6,9% para H1 y de 9,65% a 48% para H3. No se observaron diferencias significativas entre ambas técnicas a escala de granja (H1: $p=0,20$; H3: $p=0,11$). La concordancia entre las pruebas fue nula al tomar como unidad de referencia el animal (H1: 0,005; H3: 0,070), mientras que en términos de establecimiento fue escasa (H1: 0,350; H3: 0,235). Considerando la alta prevalencia individual obtenida por la prueba de IHA y la alta sensibilidad de esta técnica, se podría sugerir que en las poblaciones porcinas de la Argentina circularon cepas virales humanas o cepas porcinas con gran proximidad filogenética a las utilizadas en este estudio desde el año 2002.

Palabras clave: Influenza, Argentina, prevalencia, serología, concordancia

ABSTRACT

Seroprevalence of the swine Influenza virus in fattening pigs in Argentina in the 2002 season: evaluation by hemagglutination-inhibition and ELISA tests. The seroprevalence of the Influenza virus against H1N1 and H3N2 was determined by the hemagglutination-inhibition test (HI) and a commercial swine influenza ELISA kit, in 13 Argentinean swine herds. The results of within-herd and between-herd prevalence obtained by both tests were statistically correlated. The within-herd prevalence observed by the HI test varied from 38.46 to 100% against H1 and 7.69 to 100% for H3. When the within-herd prevalence was measured with the ELISA test, it varied from 2.33 to 6.9% for H1 and 9.65 to 48% for H3. No statistical differences were observed at herd level between HI and ELISA (H1: $p=0.20$; H3: $p=0.11$). No agreement between HI and ELISA detected prevalence was observed when the within-herd prevalence was compared (H1: 0.005; H3: 0.070), while the agreement at herd level was considered poor (H1: 0.350; H3: 0.235). The high within-herd prevalence values observed with the HI test and the high sensibility of this test might show that human strains or swine strains phylogenetically closely related to the humans strains used in the HI test in this study have been affecting the swine population since 2002.

Key words: Influenza, Argentina, prevalence, serology, agreement

INTRODUCCIÓN

El cerdo es susceptible de ser infectado por el virus de influenza tipo A, el cual se clasifica en subtipos según sus glicoproteínas de superficie denominadas hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). Se conocen 16 subtipos de hemaglutinina (1 a 16) y 9 subtipos de neuraminidasa (1 a 9), que pueden presentarse en distintas combinaciones (11). En los cerdos de EE.UU. el subtipo H1N1 "clásico", se asoció durante más de 80 años con cuadros respiratorios, hasta que en el año

1998 emergió el subtipo H3N2. Este último produce cuadros respiratorios y reproductivos (21). En la Unión Europea (UE), la forma respiratoria de influenza fue producida hasta 1979 por el subtipo H1N1 "clásico"; posteriormente por el subtipo H1N1 "aviar" y en 1984 por el subtipo H3N2 (1, 2). En la UE y Asia se describió un tercer subtipo, el H1N2, en poblaciones porcinas (1, 20). Finalmente se estableció que las tres cepas aisladas de las poblaciones porcinas de EE.UU., la UE y Asia diferían tanto en términos genéticos como antígenicos (21).

El virus de influenza tiene la propiedad de aglutinar glóbulos rojos de diferentes especies por interacción de la HA viral y el receptor viral ubicado en la superficie de los eritrocitos. Ese fenómeno, denominado hemaglutinación, puede ser inhibido específicamente por los anticuerpos que se producen contra cada subtipo viral. Esta propiedad constituye la base de la prueba de inhibición de la hemaglutinación (IHA), que tiene moderada sensibilidad pero alta especificidad (8, 10, 22). La prueba de ELISA posee una especificidad comparable a la prueba de IHA (22), si bien su sensibilidad es baja en infecciones tempranas (6 días posinfección), aunque aumenta de manera significativa a los 28 días posinfección (22). Esto probablemente se deba a diferencias en los isotipos de anticuerpos detectados por cada uno de ellos; así, la prueba de ELISA solamente determina IgG, mientras que la de IHA detecta tanto IgM como IgG (22). En la actualidad se dispone de equipos comerciales para la detección de anticuerpos anti H1 y anti H3 (10, 12).

En Argentina, un estudio de prevalencia serológica realizado durante el año 2001 por las pruebas de IHA contra el subtipo H3 (5 granjas) y de ELISA contra el subtipo H1 (17 granjas) dio respectivamente como resultado 80% y 41,2% de granjas positivas, con una alta prevalencia intragranja contra el subtipo H3 (18). Por la técnica de inmunohistoquímica, se identificó el virus de influenza en lesiones de neumonía necrótica en cerdos (16). Sin embargo, durante el período de estudio no se presentaron informes de aislamiento viral en nuestro país.

Los objetivos de este trabajo fueron determinar mediante las técnicas de IHA y ELISA la prevalencia de anticuerpos del virus de influenza A, subtipos H1 y H3, en granjas de cerdos en confinamiento de la Argentina durante la temporada invernal 2002 y comparar los resultados en términos individuales y de establecimiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras provinieron de 13 granjas de ciclo completo. Las granjas estudiadas estaban ubicadas en las provincias de Buenos Aires (n = 7), Santa Fe (n = 3) y Córdoba (n = 3). Las muestras se obtuvieron de cerdos de las etapas de engorde-terminación (16 a 23 semanas); se obtuvieron en promedio 26 sueros por granja. Se realizó la evaluación serológica de 693 sueros por la técnica de IHA, de 685 sueros por la técnica de ELISA y de 680 por ambas técnicas.

Prueba de IHA

Se utilizaron como antígenos 2 cepas de influenza A humano, la A/Sydney/5/97 H3N2 (H3) y la A/Bayern/7/95 H1N1 (H1), de circulación en el país. Los sueros fueron tratados con una enzima destructora de receptores (Denka Seiken, Tokio, Japón) y luego adsorbidos con glóbulos rojos de pavo para remover los inhibidores inespecíficos. Las muestras se sembraron en microplacas de 96 pocillos con fondo en V; se efectuaron diluciones seriadas de los sueros en base 2 partiendo de una dilución inicial 1:10. Se adicionó un volumen del antígeno viral ajustado a 4 unidades hemaglutinantes. Las placas se incubaron

durante 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, se agregó una suspensión de glóbulos rojos de pavo al 0,5% en PBS 0,01 M pH 7,2. Se realizó una segunda incubación de 30 min a temperatura ambiente y se procedió a la lectura de los resultados. Las placas fueron colocadas en posición vertical, para permitir que los botones de sedimentación se deslizaran desde el fondo de las placas. El título de anticuerpos de la muestra de suero se consideró la inversa de la dilución más alta en la que se observó IHA. Para muestras individuales, títulos de IHA de 10 a 20 fueron considerados sospechosos y títulos de 40 o superiores fueron considerados positivos. El establecimiento se consideró positivo cuando presentaba, al menos, un suero positivo. De cada granja se calculó el título geométrico medio (TGM), que expresó la media de los títulos de los sueros considerados positivos, sospechosos y negativos.

Prueba de ELISA

Se utilizó un ELISA indirecto comercial con un 99,8% de sensibilidad y un 99,7% de especificidad en relación con la prueba de IHA, considerada como la prueba de referencia (*gold standard*) (IDEXX Laboratorios SIV H1N1 y H3N2, Maine, EE.UU.) (10). La densidad óptica se midió en un espectrofotómetro a 650 nm de longitud de onda (Labsystems Multiskan MS, Finlandia). Las muestras se consideraron negativas o positivas sobre la base del cálculo del S/P ratio, con un valor de corte de 0,4 (< 0,4 negativo, $\geq$ 0,4 positivo).

Análisis estadístico

Los resultados se analizaron por la prueba de homogeneidad de Chi cuadrado sobre las proporciones de casos individuales y la proporción de establecimientos positivos con un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$). Para establecer la concordancia entre las pruebas de IHA y ELISA, tanto en términos individuales como de establecimiento, se calculó el coeficiente kappa (k) de Cohen. El grado de concordancia de las pruebas se evaluó de la siguiente manera: a) $k = 0,00 - 0,20$, concordancia nula; b) $k = 0,21 - 0,40$, concordancia escasa; c) $k = 0,41 - 0,60$, concordancia buena; d) $k = 0,61 - 0,80$, concordancia muy buena; y e) $k = 0,80 - 1$, concordancia excelente.

RESULTADOS

La prevalencia intragranja por la técnica de IHA varió entre 38,46% y el 100% para H1 y entre el 7,69% y el 100% para H3, mientras que por la técnica de ELISA osciló entre el 2,33% y el 6,9% para H1 y entre el 9,65% y el 48% para H3. En la Tabla 1 se indica la prevalencia de los subtipos H1 y H3, así como las muestras con reacción positiva para ambos subtipos. El análisis estadístico de la prevalencia intragranja obtenida por IHA o por ELISA arrojó diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,001$).

En términos de establecimiento, no se observaron diferencias significativas entre ambas técnicas utilizadas (H1: $p=0,20$; H3: $p=0,11$). La prevalencia de los subtipos H1 y H3 en términos de granja, así como la prevalencia de ambos subtipos, se expresan en la Tabla 2.

La concordancia entre las pruebas a escala individual fue nula, mientras que al comparar entre granjas fue escasa (Tabla 3).

DISCUSIÓN

La prevalencia individual del subtipo H1 por la técnica IHA fue del 89,64% (IC 54,55% - 98,07%). Este valor se

Tabla 1. Proporción de sueros positivos por las pruebas de IHA y ELISA para los subtipos H1, H3 y H1 + H3.

	Casos Individuales					
	IHA	%	IC 95%	ELISA	%	IC 95%
H1N1	303 / 338	89,64	86,24 - 93,04	8 / 343	2,33	0,58 - 4,07
H3N2	262 / 355	73,80	69,08 - 78,51	33 / 342	9,64	6,37 - 12,92
H1N1 + H3N2	211 / 338	62,42	57,11 - 67,73	0 / 342	-	-

Tabla 2. Proporción de granjas positivas por las pruebas de IHA y ELISA para los subtipos H1, H3 y H1 + H3.

	Granjas					
	IHA	%	IC 95%	ELISA	%	IC 95%
H1N1	11 / 13	84,61	54,55 - 98,07	7 / 13	53,84	25,13 - 80,77
H3N2	9 / 13	69,23	38,57 - 90,90	4 / 13	30,76	9,09 - 61,42
H1N1 + H3N2	10 / 13	76,92	46,18 - 94,96	0 / 13	-	-

Tabla 3. Coeficiente de correlación kappa entre ambas pruebas para la detección de los subtipos H1 y H3, a escala individual y de granja.

	Casos Individuales		Granjas	
	ELISA - IHA (H1)	ELISA - IHA (H3)	ELISA - IHA (H1)	ELISA - IHA (H3)
Valor de kappa	0,005	0,070	0,350	0,235
Valor de <i>p</i>	0,330	0,0003	0,09	0,188
IC (95%)	0,001 - 0,009	0,043 - 0,096	-0,052 - 0,752	-0,054 - 0,524

aproxima a los valores observados en EE.UU. entre los años 1998 y 2000 (66,3% - 100%) (4), y a su vez difiere de los descritos para la cepa porcina clásica en Europa (20% - 25%) y en China (3,4% - 12%) (1, 7). En EE.UU. y Asia, el subtipo H1N1 está relacionado filogenéticamente con cepas humanas, mientras que en la UE el subtipo H1N1 predominante está relacionado con cepas de origen aviar (14).

Considerando la alta prevalencia individual obtenida por la prueba de IHA y la alta sensibilidad de esta técnica, se podría sugerir que en las poblaciones porcinas de la Argentina circularon cepas virales humanas o cepas porcinas con gran proximidad filogenética a las utilizadas en este estudio desde el año 2002.

En relación con el subtipo H3N2, en EE.UU. no se describieron casos clínicos por cepas antigénicamente relacionadas con cepas humanas hasta 1984 (1, 5). Se demostró que existe reacción cruzada entre cepas, en particular con la cepa A/Sydney/5/97 H3N2 (19). Sin embargo, este subtipo, resultante de una doble o triple recombinación, contiene material genético de cepas humanas (HA, NA, PB1). Desde 1998 se observaron infecciones naturales, respuesta inmune y aislamientos de

este subtipo viral (15, 23). En nuestro estudio, la prevalencia serológica a escala individual fue de 73,8% (IC 69,08% - 78,51%), valor cercano a los descritos en EE.UU. (65,1%) y en México (56%) (6, 21), y distinto de los registrados en la UE y en Asia (4, 12, 13). Sin embargo, en términos de establecimiento, los resultados obtenidos con ELISA (H1 y H3) fueron diferentes de los descritos en otros países (10).

La detección de anticuerpos contra los subtipos H1 y H3 muestra una variabilidad considerable según el país donde se realizó el estudio. Así por ejemplo, la prevalencia en Corea fue del 25,3% (9); en México del 6,6% (6) y en EE.UU. del 1,4% - 2,5% (4). En este trabajo, el alto porcentaje de sueros positivos para ambos subtipos (62,42%) fue similar al porcentaje de establecimientos positivos (76,92%). Fue documentada la ausencia de reactividad cruzada entre los subtipos H1 y H3 (21), por lo que estos resultados reflejarían la circulación de los dos subtipos.

Ambas pruebas serológicas tienen una sensibilidad variable y alta especificidad (3), y no hay consenso respecto de la concordancia entre ellas, que en algunos casos fue nula (8) y en otros alcanzó un valor mayor del

80% (3, 17). En este estudio se observó una concordancia nula a escala individual y escasa en términos de establecimiento. Esto podría explicarse por los diferentes antígenos utilizados en la prueba de IHA (cepas de origen humano) y ELISA (cepas porcinas) (17).

Probablemente, las diferencias observadas entre ambas pruebas se deban a sus características inherentes, a los diferentes antígenos utilizados y a los isotipos de anticuerpos detectados por cada una de ellas.

Durante el período en que se desarrolló este trabajo, en la Argentina no se registraron casos clínicos confirmados de influenza A en las poblaciones porcinas. Asimismo, no se registraron aislamientos virales provenientes de cerdos. Se descarta la posibilidad de detección de anticuerpos vacunales, ya que no existen vacunas comerciales disponibles en el mercado. Los resultados obtenidos reflejan la circulación del virus de influenza A subtipos H1 y H3 en la población porcina nacional desde el año 2002.

Debido a la pobre concordancia observada entre las pruebas diagnósticas utilizadas en este estudio, se sugiere que la prueba de ELISA sería de utilidad para el diagnóstico en términos de establecimiento, ya que detectó al menos un animal positivo en cada granja evaluada. El relevamiento y la actualización de las cepas circulantes no solo resultarían beneficiosos para la industria porcina, sino también para los programas de salud pública que deben conocer las nuevas variables del virus involucradas.

Agradecimientos: este trabajo fue realizado con fondos del subsidio BID 1728 OC/AR, PICT 2005 -33987.

BIBLIOGRAFÍA

1. Brown IH. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. *Vet Microbiol* 2000; 74: 29-46.
2. Brown IH. The pig as an intermediate host for influenza A viruses between birds and humans. *Int Congr Ser* 2001; 1219: 173-8.
3. Chittick W, Holck JT, Polson D, Ricket L. Capabilities of two swine influenza H1N1 serologic assays. The 17th International Pig Veterinary Society Congress (Harris H, editor), 2002, p. 177, Ames, Iowa, USA.
4. Choi YK, Goyal SM, Joo HS. Prevalence of swine influenza virus subtypes on swine farms in the United States. *Arch Virol* 2002; 147: 1209-20.
5. Easterday BC, Van Reeth K. Swine Influenza. En: Straw B, D'Allaire S, Mengeling WL, Taylor DJ, editors. *Disease of Swine* 8th ed. Ames, Iowa, Iowa State University Press, 1999, p. 277-90.
6. Fleites MA, Rodríguez Buenfil JC, Carrasco AC, Rodríguez Guzmán L, Ayora Tavera G, Segura Correa JC. Serological profile of porcine influenza, *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus pleuropneumoniae*, in farms of Yucatán, México. *Vet Mex* 2004; 35: 295-305.
7. Haiyan L, Kangzheng Y, Xiaoguang X, Huanliang Y, Yaming L, Yunan Q, *et al.* Serological and virological surveillance of swine in China from 2000 to 2003. *Int Congr Ser* 2004; 1263: 754-7.
8. Janke BH. Diagnosis of swine influenza. *Swine Health Prod* 2000; 8: 79-84.
9. Jung K, Song D, Kang B, Oh J, Park B. Serologic surveillance of swine H1 and H3 and avian H5 and H9 influenza A virus infections in swine population in Korea. *Prev Vet Med* 2007; 79: 294-303.
10. Jung T, Choi C, Chung H, Kim J, Cho W, Jung K, *et al.* Herd-level seroprevalence of swine-influenza virus in Korea. *Prev Vet Med* 2002; 53: 311-4.
11. Kim WI, Wu WH, Janke B, Yoon KJ. Characterization of the humoral immune response of experimentally infected and vaccinated pigs to swine influenza viral proteins. *Arch Virol* 2006; 151: 23-36.
12. Lee BW, Bey RF, Baarsch MJ, Simonson RR. ELISA method for detection of influenza A infection in swine. *J Vet Diagn Invest* 1993; 5: 510-5.
13. Maldonado J, Van Reeth K, Riera P, Sitjà M, Subi N, Espuña E, *et al.* Evidence of the concurrent circulation of H1N2, H1N1 and H2N3 influenza A viruses in densely populated pig areas in Spain. *Vet J* 2005; 172: 377-81.
14. Marozin S, Gregory V, Cameron K, Bennett M, Valette M, Aymard M, *et al.* Antigenic and genetic diversity among swine influenza A H1N1 and H1N2 in Europe. *J Gen Virol* 2002; 83: 735-45.
15. Olsen CW. The emergence of novel swine influenza viruses in North America. *Virus Res* 2002; 85: 199-210.
16. Piñeyro PE, Quiroga MA, Cappuccio JA, Machuca MA, Ramos Vara J, Perfumo CJ. Neumonía necrótica proliferativa: descripción de un caso e identificación de los agentes etiológicos. Quinto Congreso de Producción Porcina del MERCOSUR, 2006, p. 286, Córdoba, Argentina.
17. Skibbe D, Zhou E, Janke BH. Comparison of commercial enzyme-linked immunosorbent assay with hemagglutination inhibition assay for serodiagnosis of swine influenza virus (H1N1) infection. *J Vet Diagn Invest* 2004; 16: 86-9.
18. Teodoroff TA, Pecoraro MR, Baumeister E, Janke BH, Machuca M, Cappuccio JA, *et al.* Serological and immuno-histochemical studies of influenza virus in fattening pigs in Argentina. 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases, 2003, p. 262-3, Roma, Italia.
19. Van Reeth K, Brown I, Essen S, Pensaert M. Genetic relationships, serological cross-reaction and cross-protection between H1N2 and other influenza A virus subtypes endemic in European pigs. *Virus Res* 2004; 103: 115-24.
20. Van Reeth K, De Vleeschauwe A, Kyriakis C, Pensaert M. Influenza in birds, pigs and humans: Old theories versus current viewpoints. 19th International Pig Veterinary Society Congress, 2006, p. 26-35, Copenhagen, Denmark.
21. Webby RJ, Swenson SL, Krauss SL, Gerrish PJ, Goyal SM, Webster RG. Evaluation of swine influenza viruses in the United States. *J Virol* 2000; 74: 8243-51.
22. Yoon KJ, Janke BH, Swalla RW, Erickson G. Comparison of commercial H1N1 enzyme-linked immunosorbent assay and hemagglutination inhibition test in detection serum antibody against swine influenza viruses. *J Vet Diagn Invest* 2004; 16: 197-201.
23. Zhou N, Senne D, Landgraf J, Swenson S, Erickson G, Rossow K, *et al.* Genetic reassortment of avian, swine, and human influenza A viruses in american pigs. *J Virol* 1999; 73: 8851-6.