

**Fernando A. Osorio, MV, MS, Ph.D.**  
**Veterinary Diagnostic Center**

*Department of Veterinary & Biomedical Sciences*  
**University of Nebraska-Lincoln**  
**Lincoln, NE 68583-0905, U.S.A.**

Durante los últimos veinticinco años, y en forma coincidente con el aumento progresivo en la aplicación de técnicas intensivas de producción porcina, la Enfermedad de Aujeszky (EA, también llamada Seudorabia) se transformó en una de las más importantes causas de pérdidas económicas para los productores porcinos en todo el mundo. La EA es causada por un herpesvirus, y afecta a los planteles ocasionando pérdidas reproductivas en hembras gestantes, así como también debilitamiento, incoordinación, convulsiones y muerte súbita de los lechones. La mortalidad atribuida a la EA cuando afecta a los planteles de engorde y terminación es menor que cuando afecta a lechones. Es precisamente en el engorde en donde es común observar síntomas respiratorios de EA, aunque en ese segmento de la producción la EA también puede presentarse con síntomas nerviosos, inapetencia, vómitos, depresión y fiebre. Como es el caso en todos los herpesvirus, una característica fundamental del virus de la EA es el desarrollo de fases latentes de la enfermedad. El virus de la EA se puede perpetuar en hatos en forma permanente debido a la capacidad de este agente para causar ciclos intermitentes de latencia y reactivación en el hospedador porcino, lo cual puede resultar en excreción de virus EA infeccioso y transmisión a otros animales susceptibles ( figura 1)

### **Erradicación de la Enfermedad de Aujeszky**

La erradicación de la EA es un objetivo que figura en los planes sanitarios de muchos países del mundo. En los Estados Unidos, la campaña de erradicación comenzó en el año 1989. El objetivo fundamental de la campaña de Aujeszky en Estados Unidos centro, desde su esbozo inicial, en la completa erradicación del virus de los planteles porcinos hacia fines del año 2000. Si bien esa fecha « target » se ha extendido hasta la actualidad, la campaña de erradicación en los Estados Unidos está muy avanzada, y es de esperar que para el mes de diciembre del 2003, todos los estados que conforman EEUU estén con estadio V de erradicación (estadio V= Libre de PRV). Eso incluye el Estado de Iowa. Los standards y pautas normativas de esta campaña fueron convalidados por el gobierno federal pero realmente implementados por el gobierno de cada uno de los estados en forma independiente. Se cree que durante el relevamiento inicial e implementación de la campaña de erradicación de Aujeszky en los Estados Unidos la cifra de granjas cuarentenadas por poseer EA habría alcanzado el orden de las decenas de miles. No obstante, en este momento ( Mayo de 2003) no hay granjas cuarentenas con EA en todo el territorio nacional.. Tal cifra habla a las claras del significativo progreso que la campaña ha experimentado en los Estados Unidos. Si bien es cierto . A su vez, los 15 países miembros de la Comunidad Europea ya tienen en vigencia algún programa de control y erradicación de EA. Inglaterra y Dinamarca están clasificados como "países libres de EA" desde el año 1992, Finlandia lo está desde el año 1994 y Suecia ha pasado recientemente a ser el primer país europeo que erradicó la EA mediante el uso de vacunas diferenciales acopladas a estrategias de test y remoción de los animales infectados. Tanto en los Estados Unidos como en Europa la infección por virus de la EA tiene una alta prevalencia en las poblaciones de cerdos silvestres. No obstante, se acepta que si se mantiene una separación adecuada de los canales de comercialización y faena para cerdos silvestres y domésticos se puede perfectamente prevenir el riesgo de transmisión de infección de cerdos silvestres a domésticos.

Los adelantos biotecnológicos han resultado de fundamental importancia para la efectividad de la campaña nacional contra la EA, en especial en lo que hace a métodos de diagnóstico y al desarrollo de vacunas diferenciales.

### **Metodos Diagnósticos para la EA**

La fase aguda de la EA está caracterizada por la replicación de virus de EA en las mucosas que sirven como puerta de entrada a la infección y en los diferentes órganos "target" a los cuales el virus se disemina. En este caso el método diagnóstico de elección ha sido siempre el aislamiento de virus infeccioso en cultivos celulares o la detección directa de antígenos virales en los tejidos afectados. Por el contrario, en un animal convalesciente de la EA que ha sobrevivido a una infección aguda con este virus, los parámetros

anteriores ya no se aplican, ya que el virus de EA ha de persistir en el animal convalesciente en estado de latencia, lo cual significa un estado durmiente en el que el virus no se expresa y durante el cual es imposible detectar el virus por técnicas comunes de aislamiento viral a partir de homogeneizados de tejidos (figura 1).

En el caso de animales infectados en forma latente, tal vez la detección de anticuerpos específicos contra el virus de EA sea el indicador más fidedigno de infección. Si bien es cierto que se han descrito ciertos casos raros en los que animales infectados en forma latente no poseerían anticuerpos específicos del virus detectables, la serología es efectiva en la gran mayoría de animales infectados en forma latente (figura 1).

En la tabla 1 se enumeran las pruebas serológicas para EA que se han desarrollado durante la última década. Por muchos años, la prueba de virus-suero neutralización (SN) ha constituido el estándar por excelencia para el diagnóstico serológico de EA por muchos años. Si bien es cierto que la SN es la más específica de las pruebas serológicas para el virus de EA, es también la menos sensible de las pruebas serológicas oficiales actualmente usadas en los Estados Unidos. Otras pruebas tales como la aglutinación de latex (tanto en los formatos manual o automatizado), la ELISA y el PCFIA ("Particle Concentration Fluorescence Immuno-Assay") son más sensibles que la SN. Al mismo tiempo, estas otras pruebas producen resultados de menor especificidad que la SN, lo que se traduce en una mayor incidencia de reacciones "falso positivo". La prueba PCFIA es un inmuno-ensayo de fluorescencia que se basa en la utilización de una fase sólida representada por esferas de poliestireno sobre las cuales hay adsorbidos antígenos del virus de EA. La reacción de PCFIA usa un conjugado compuesto de anticuerpos monoclonales contra virus de EA marcados con fluoresceína. La ELISA y el PCFIA son las dos únicas pruebas serológicas para virus de EA que se producen en un formato diferencial (definición de test diferencial: una prueba que permite distinguir entre anticuerpos conferidos por vacunación o por infección natural) que es específico para anticuerpos contra la glucoproteína gE (antiguamente denominada gl). Por lo tanto las dos pruebas (ELISA y PCFIA) son las dos únicas que son compatibles con los planes de erradicación de EA basados en el uso de vacunas "marcador".

Recientemente, a través del uso de la PCR (reacción de la polimerasa en cadena) se ha hecho posible determinar, con gran sensibilidad, el estatus preciso de infección de un animal en particular, lo cual ha hecho posible responder al problema creado por los reactores positivos únicos ("Single reactors"). Los reactores positivos únicos son un típico dilema epidemiológico que se crea toda vez que se incrementa el número de reacciones serológicas para EA que se llevan a cabo en una región o establecimiento. Se entiende por reactor positivo único (SR, Single reactor) la presencia de un único (o unos muy pocos) animal(es) positivo(s) en un plantel o granja que por todos los otros parámetros era de esperar que fuese un establecimiento negativo para infección por virus de EA (1). Nuestro laboratorio en la Universidad de Nebraska sirve como uno de los centros nacionales de referencia por PCR para casos de "single reactors" (SR). A lo largo de más de 11 años de proveer este servicio de PCR en nuestro laboratorio, hemos confirmado que la gran mayoría de los casos de SR se tratan de reacciones serológicas de falsos positivos. La PCR también ha posibilitado la cuantificación de la carga (tenor) de virus de EA que esté infectando en forma latente los tejidos de un animal. Tal propiedad ha resultado de gran valor para medir y comparar la capacidad de las vacunas de EA para proteger contra la enfermedad (4).

## **Vacunas contra EA**

El uso de vacunas contra EA ha sido siempre visto en forma favorable por los productores, debido a la excelente relación costo-beneficio de estos productos cuando se trata de prevenir las pérdidas clínicas ocasionadas por la enfermedad. Este ha sido precisamente el caso para las vacunas a virus vivo (vacunas atenuadas), porque este tipo de vacunas son más potentes, desde el punto de vista inmunogénico, que las vacunas inactivadas. La tendencia histórica a usar inmunización contra la EA comienza con el uso de infección planificada (tabla 2), método primitivo y riesgoso basado en el uso de cepas de campo que busca la seroconversión masiva del hato en un momento en que se presenten mínimos efectos clínicos sobre la población. Posteriormente se avanzó con el uso de vacunas inactivadas, seguido de vacunas atenuadas por métodos clásicos y finalmente por vacunas obtenidas por ingeniería genética. A lo largo de todos estos años se propició el uso de diferentes tipos de vacunas. Cada una de ellas presenta sus ventajas y desventajas, y cada una de estos tipos de vacunas cumplió una función en un periodo específico de las campañas contra la EA. (tabla 2)

### Vacunas de EA inactivadas:

Pocas son las ventajas que se puedan citar en relación a este tipo de vacunas contra EA. Como puntos positivos se puede mencionar que las vacunas a virus muerto producían un título serológico de vacunación más bajo que las vacunas vivas. Tal característica, en las épocas previas al uso de ensayos diagnósticos marcadores, permitía que el hato se tornara seronegativa para EAV (y así liberarse de una penalización regulatoria) en forma más rápida. Si bien se consideró a las vacunas de EA a virus muerto como más seguras que las vivas, tal calificación era relativa al tipo de inactivante que se usara y al control de inactivación llevado a cabo por el fabricante. No era infrecuente la ocurrencia de accidentes de infección de hatos por deficiente inactivación de las cepas virulentas usadas para confeccionar la vacuna muerta. Además de este punto, las dos principales desventajas de este tipo de vacunas eran su pobre eficacia y su alto costo de fabricación.

### Vacunas Atenuadas (a Virus Vivo Modificado)

Realmente el avance de las campañas de control y erradicación de la EA fue impulsado por la adopción de cepas vacunales atenuadas. En el caso especial del virus de Aujeszky las cepas vacunales atenuadas fueron tradicionalmente muy seguras y eficaces, sin evidencia alguna de reversión a virulencia o pérdida de la eficacia inmunológica por mutaciones del virus de campo. Además de lo dicho, las principales ventajas ofrecidas por las vacunas de EA a virus vivo serían: 1) su duración de inmunidad francamente superior a la vacuna inactivada, 2) su capacidad de producir una inmunidad semejante al virus de campo salvaje, 3) su capacidad de detener los síntomas clínicos de un brote en forma rápida, y 4) su eficiencia desde el punto de vista económico. Las desventajas o puntos de cautela en relación a las vacunas a virus vivo serían: 1) posibilidad de bloqueo de la eficacia en animales jóvenes por interferencia ocasionada por inmunidad pasiva calostrada, 2) la necesidad de mayores controles de la cepa semilla de fabricación para evitar la diseminación de contaminantes adventicios, y 3) la virulencia residual para especies animales diferentes del porcino.

### Vacunas con «Marcador» y Genéticamente Modificadas por Ingeniería Genética:

No obstante las ventajas mencionadas anteriormente, antes de la aparición de vacunas diferenciales, el uso de vacunas atenuadas representaba también un cierto retraso u obstáculo para un productor que estuviera interesado en llevar a cabo un plan de erradicación, debido a la imposibilidad de diferenciar los anticuerpos producidos por vacunación de aquellos causados por infección natural. Es así que el concepto de vacunación contra EA se volvió compatible con el de erradicación de infección tan solo después de la aparición de vacunas diferenciales "marcador". Estas nuevas vacunas contra EA son diseñadas o seleccionadas con una supresión o eliminación de ciertos genes de sus genomas. Como consecuencia de esta supresión o eliminación de un gen, estas cepas vacunales no tienen la capacidad de producir la proteína codificada por este gen y en consecuencia la proteína no es presentada al sistema inmune del animal vacunado. Por lo tanto, si existen anticuerpos específicos contra la proteína "marcadora" en el suero del animal es porque el animal ha sido infectado con virus de campo (también llamado virus tipo salvaje) el cual efectivamente contiene la proteína en cuestión. Para que sean completamente eficaces, estas vacunas "marcador" deben ser usadas con kits de diagnóstico complementarios que detectan anticuerpos específicos para la proteína usada como antígeno marcador (5). Además de poseer, gracias a las técnicas de ingeniería genética, la capacidad de aplicar diferentes marcadores serológicos (gE, gC, y gG) algunas de estas vacunas también carecen de genes importantes para la virulencia del virus (por ejemplo: el gen de la timidina-quinasa, TK) lo cual facilita una completa atenuación de estas cepas vacunales (3).

Tal vez el requisito más importante para el uso exitoso de una vacuna de EA con capacidad de "marcador" consiste en que la proteína que se selecciona para ser usada como marcador sea expresada por la totalidad de las cepas virulentas de campo del virus de la EA y que en consecuencia, en todos los casos de infección natural, las cepas de campo evoquen una respuesta serológica vigorosa contra el antígeno marcador. Es esencial entonces que la respuesta serológica producida por el antígeno marcador reproduzca en intensidad y persistencia temporal la respuesta inducida por el virus infeccioso propiamente dicho (figura 2). De entre todas las proteínas del virus de EA que se han propuesto como marcadores serológicos para diagnóstico diferencial la gE ha sido la más estudiada. Se sabe que la gE es expresada por todas las cepas de campo de virus EA que se analizaron en Europa y en los Estados Unidos. Por lo

tanto, las vacunas carentes de proteínas gE son las vacunas más comúnmente usadas para vacunación diferencial contra EA. Tanto en los Estados Unidos como en la Comunidad Europea las vacunas carentes de gE son las únicas aceptadas para ser usadas en programas de erradicación. Con la única excepción de Japón (donde más de un tipo de marcador puede ser usado por diferentes prefecturas) el resto de la comunidad mundial tiende a favorecer el uso exclusivo de vacunas carentes de gE.

El uso de vacunas recombinantes que se tratan de cepas vivas atenuadas de virus de EA llevó a algunos investigadores a proponer la posibilidad teórica de que pueda ocurrir una recombinación genética entre vacunas recombinantes carentes de diferentes genes y por lo tanto complementarias entre sí. De tal recombinación entre vacunas complementarias entre sí se podrían obtener, según esta hipótesis, nuevas variantes que rescatasen el tipo salvaje virulento del virus de EA original. Se sugirió, además, que por recombinación entre estas vacunas recombinantes (« marcador-negativas ») con virus salvaje de campo se podrían teóricamente obtener nuevas cepas virulentas que aún así carecerían de la proteína « marcador » y por lo tanto escaparían a la detección serológica. La primera posibilidad fue debidamente neutralizada a través del uso precautorio de un solo tipo de marcador serológico en una región o país, evitando así el posible uso simultáneo de dos diferentes tipos de marcadores en un mismo animal o granja, y la posible regeneración de tipo salvaje. Con respecto a la segunda posibilidad, la cual es válida al menos desde el punto de vista teórico, todas las evidencias acumuladas a través de diversos estudios niegan su significación. Las vacunas carentes de gE (« gE-negativas ») han sido usadas por más de 25 años en Europa y en USA. Durante tan largo tiempo nunca se ha detectado o reportado la existencia de una cepa de campo que carezca de la proteína gE. Estas observaciones sugieren que la chance de generación de una cepa virulenta que sea al mismo tiempo gE negativa es muy baja. Al mismo tiempo estos datos retrospectivos también reafirman el hecho de que la gE es una proteína esencial para la sobrevivencia del virus EA en la naturaleza (es decir en el animal hospedador), aunque la proteína pueda ser obvia para la multiplicación del virus en cultivos celulares durante la elaboración de la vacuna (3).

### **Vacunas y Latencia del Virus de EA**

Si bien se ha aceptado tradicionalmente que las vacunas de EA no protegen contra la infección latente, datos de investigaciones llevadas a cabo en nuestro laboratorio indican que la administración de cepas vacunales atenuadas por vía intranasal minimiza o suprime completamente la carga de virus latente en los tejidos de los animales vacunados y posteriormente infectados con virus virulento (4). Eso sería una razón adicional para el uso de la vacuna por vía intranasal, método tradicionalmente usado para conferir una inmunidad más duradera en el animal joven.

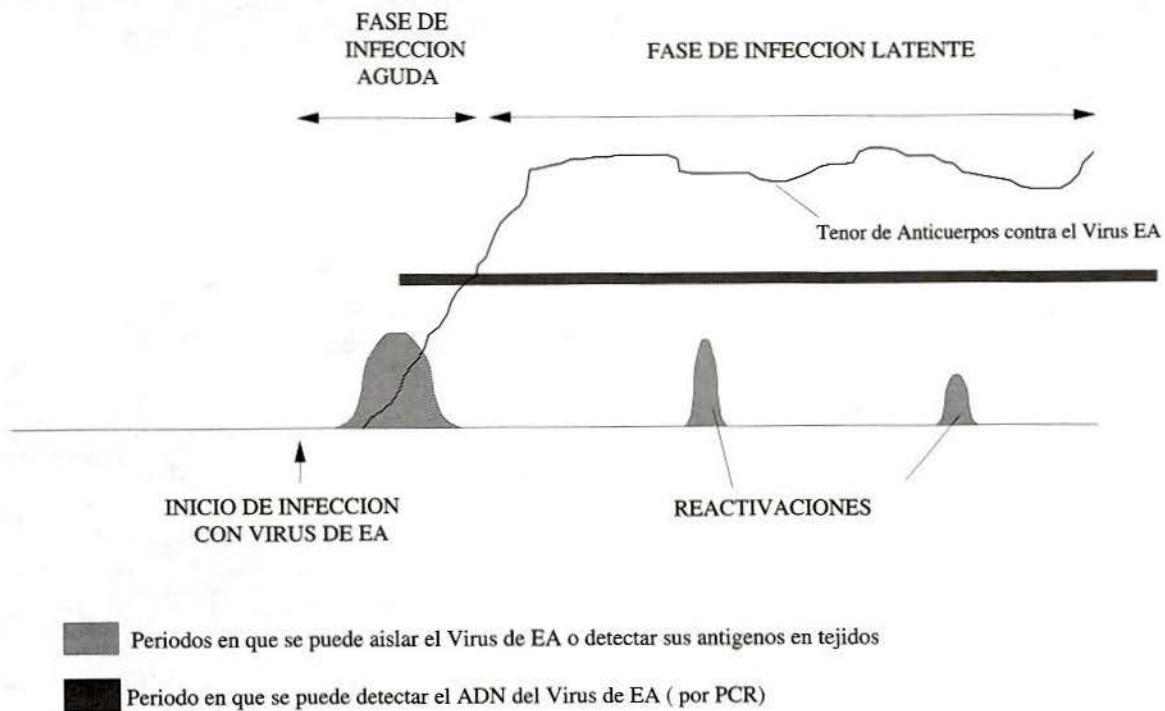
### **Nuevas tendencias en el área de investigaciones sobre el virus de la EA**

El virus de la EA continúa atrayendo la atención de muchos investigadores alrededor del mundo. Este virus es muchas veces usado como modelo de verificación de nuevos conceptos de tecnología de punta. (por ejemplo, vacunas a ADN) En resumen, si bien es cierto que el éxito de las campañas actuales para la erradicación del virus de EA demuestra que ya están disponibles las herramientas para una erradicación efectiva de la enfermedad, es de esperar que la significación económica del virus de EA determine que este virus continúe siendo el centro de atracción del interés de muchos investigadores por muchos años más.

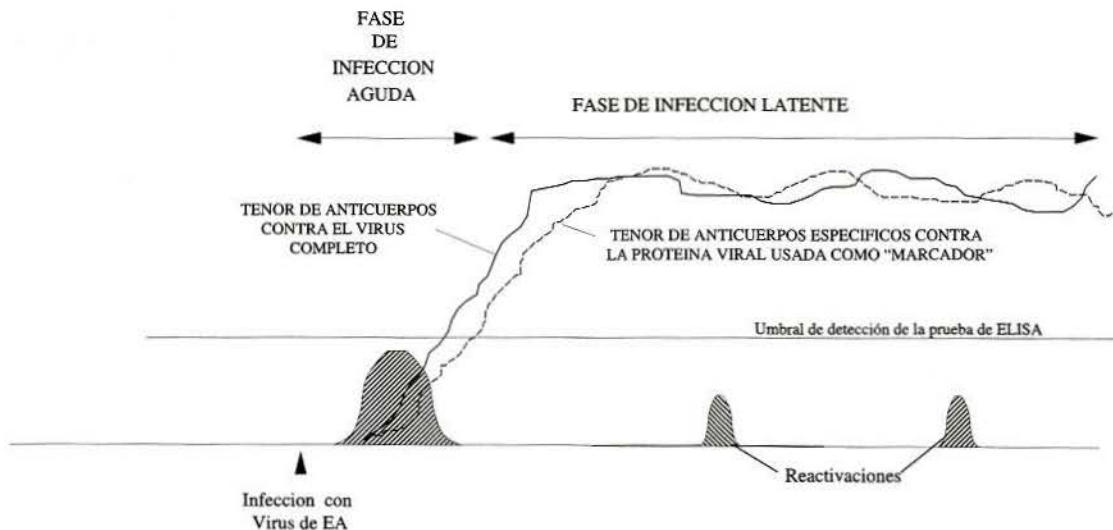
### **Referencias Bibliográficas**

1. Anelli, J.F., Morrison, R.B., Goyal, S.M., Bergeland, M.E., Mackey, W.J., and Thawley, D.G. 1991. Pig herds having a single reactor to serum antibody tests to Aujeszky's disease virus. *Vet Rec* 128: 49-53.
2. Gerdtz, V., Jons, A., Makoschey, B., Visser, N., and Mettenleiter, T.C. 1997. Protection of pigs against Aujeszky's Disease by DNA vaccination. *J gen Virol* 78: 2139-2146
3. Mettenleiter, T.C. 1996. Immunobiology of pseudorabies (Aujeszky's disease) *Vet Immun Immunopath* 54: 221-22
4. Schang, L.M., Kuitsh, G., and Osorio, F.A. 1994. Correlation between pre-colonization of trigeminal ganglia by attenuated strains of Pseudorabies virus and resistance to Wild-type virus. *J Virol* 68: 8470-8476.

5. Van Oirschot, J., Rziha, H.-J., Moonem, P., Pol, J., and van Zaane, D. 1986. Differentiation of serum antibodies from pigs vaccinated or infected with aujeszky's disease virus by a competitive enzyme immuno-assay. *J. Gen. Virol.* 67: 1179-82
6. Van Zijl, M., Wensvoort, G., de Kluyver, E., Hulst, M., van der Gulden, H., Gielkens, A., Berns, A. and Moormann, R. 1991. Live attenuated pseudorabies virus expressing envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus protects swine against both pseudorabies and hog cholera. *J Virol* 65: 2761-2765
7. Van Oirschot, J. T..1994. Vaccination in food animal populations. *Vaccine* 12(5):415-418.
8. Van Oirschot, J.T., A.L. Gielkens, et al. Marker vaccines, virus protein-specific antibody assays and the control of Aujeszky's disease, 1990. *Vet Microb* 23:85-101.
9. Flores, E., Osorio, F.A. et al. 1993. Efficacy of a deletion mutant bovine herpesvirus-1 (BHV-1) vaccine that allows serologic differentiation of vaccinated from naturally infected animals. *J Vet Diagn Inv* 5:534-540.
10. Kit, S.1991. Genetically engineered herpesvirus vaccines. *Prog Med Virol* 38:128-166.
11. Molitor, T. and Thawley D. 1987. Pseudorabies vaccines: past, present, and future. *Compendium on Continuing education for the Practicing Veterinarian*, Vol 9(12): F409-F416.
12. Langeveld, J.P.M. et al. 1994. First peptide vaccine providing protection against viral infection in the target animal: Studies on canine parvovirus in dogs. *J Virol* 68(7): 4506-4513
13. Mulder, W.A. M. et al. 1994. Virulence and Pathogenesis of non-virulent and virulent strains of Pseudorabies virus expressing envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus, *J gen Virol* 75: 117- 124
14. Moormann R.J.M. et al. 1996. Infectious RNA transcribed from an engineered full-length cDNA template of the genome of a Pestivirus. *J Virol* 70(2):763-770.
15. Lubroth J., and Brown, F. 1995. Identification of native foot-and-mouth disease virus non-structural protein 2C as a serological indicator to differentiate infected from vaccinated livestock. *Research in Veterinary Science* 59(1): 70-78.
16. De Smit, A.J. 2000. Classical Swine Fever: Efficacy of marker vaccines and laboratory Diagnosis. Universiteit Utrecht, faculteit Diergeneeskunde Thesis University Utrecht. Thesis
17. Commission of the European Community. 1999. Short report on the results of the large-scale laboratory trial on the Classical Swine Fever marker vaccines. Publication No. VI/7627/99, Directorate-Genral for Agriculture VI/BII.2, Brussels, Belgium.



**Figura 1 :** Dinámica de la infección por virus de EA, mostrando la secuencia temporal de aparición de anticuerpos, periodo de detección de antígeno viral, ácidos nucleicos y virus infeccioso, a lo largo de fases aguda y latente de infección (PRV: Virus de EA o Seudorabia).



**Figura 2:** Respuesta serológica ideal a una proteína escogida como marcador serológico para diagnóstico diferencial de EA. La glucoproteína ( por ejo: gE) debe inducir una respuesta inmune vigorosa y permanente en aquellos animales infectados por virus de

campo. El objetivo es que, cuando el suero de este animal se ensaye por una prueba serológica diferencial que use el antígeno gE , el animal presente una reactividad serológica positiva ( "infectado con cepa de campo de virus de EA") en cualquier punto durante el total periodo de infección.

	Optima Sensibilidad	Optima Especificidad	Posibilidad de ser Usado como Prueba Rapida "de Campo"	Deteccion de Estadio Precoz de la Infeccion	Aptitud para Procesar Gran Numero de Muestras	Diponible en Formato de Test Diferencial
SN		✓				
ELISA	✓			✓ (1)	✓	✓
AGLUTINACION DE LATEX (MANUAL).	✓		✓	✓		
AGL DE LATEX (AUTOMATICA)	✓			✓	✓	
PCFIA	✓				✓	✓

**Tabla 1:** Características fundamentales de los tests serológicos para la Enfermedad de Aujeszky

(1) ELISAs para detección de IgM contra el virus de EA : Rodak et al. Vet Microbiol 13: 121-133, 1987; McCaw et al. J Clin Microbiol 1992 30:346-350

Fase	Tipo de Vacuna	Metodo de inmunizacion
1	Covncional	<p>Infeccion Planificada</p> <p>↓</p> <p>Vacuna a Virus Muerto, uso IM</p> <p>↓</p> <p>Vacunas Atenuadas, uso IM o SC</p> <p>↓</p> <p>Vacunas Atenuada Usada por Via Intranasal</p>
2	Con Tecnologia Agregada	<p>Vacunas a Subunidad</p> <p>↓</p> <p>Eliminacion (Delecion) de una Proteina Viral como base de Test Diagnostico « Marcador »</p> <p>↓</p> <p>Atenuacion Molecular</p>
3	Aun Experimental	Vacuna a ADN ( Geneticas)

Tabla 2: Secuencia Cronologica de Progreso en el Uso de Productos para Inmunizar Contra la EA