

ENFERMEDAD DE AUJESZKY (INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE AUJESZKY)

RESUMEN

Descripción e importancia de la enfermedad: La enfermedad de Aujeszky o pseudorabia porcina está causada por un alfa herpesvirus que infecta al sistema nervioso central y a otros órganos, como el tracto respiratorio de diversos mamíferos excepto el hombre y los monos sin cola. Se asocia inicialmente a los suidos (cerdos y jabalíes), que son sus hospedadores naturales, en los que permanece latente después de la recuperación clínica (excepto en los lechones de menos de 2 semanas de edad, que mueren de encefalitis). La enfermedad se controla mediante el aislamiento de las piaras infectadas y mediante el uso de vacunas y/o la eliminación de los animales con la infección latente.

El diagnóstico de la enfermedad de Aujeszky se realiza mediante detección del agente (aislamiento del virus, reacción en cadena de la polimerasa [PCR]) y mediante la detección de una respuesta serológica en animales vivos.

Identificación del agente: El aislamiento del virus de la enfermedad de Aujeszky se puede lograr inoculando en una línea celular susceptible, como la de riñón porcino (PK-15 o SK6), o en células de riñón de cultivo primario o secundario, un extracto de tejido, por ejemplo de cerebro y amígdalas, o de material recogido de la nariz y la garganta. La especificidad del efecto citopático se comprueba mediante la inmunofluorescencia, la inmunoperoxidasa o la neutralización con un antisuero específico. El ADN vírico también puede identificarse mediante PCR, y esto se puede llevar a cabo empleando técnicas de PCR en tiempo real.

Pruebas serológicas: La presencia de los anticuerpos contra el virus de la enfermedad de Aujeszky se pone de manifiesto mediante la neutralización del virus, la aglutinación en látex o el ensayo de inmunoenzimología (ELISA). Se comercializan varios tipos de pruebas ELISA por todo el mundo. Un suero internacional estandarizado por la OIE define el límite inferior de la sensibilidad para las pruebas sistemáticas en los laboratorios que llevan a cabo el diagnóstico serológico de la enfermedad de Aujeszky.

Es posible distinguir entre los anticuerpos producidos por la infección natural y los originados después de la vacunación mediante el uso de vacunas cuyo ADN presenta genes eliminados.

Requisitos para las vacunas: Las vacunas, deben evitar o al menos limitar la excreción del virus por parte de los cerdos infectados. Las vacunas vivas recombinantes derivadas de SHV-1 cuyo ADN presenta genes eliminados o con vacunas vivas de SHV-1 con supresiones naturales, carecen de una glucoproteína específica (gG, gE, o gC), lo cual permite el empleo de pruebas de diagnóstico simultáneas para diferenciar anticuerpos vacunales de anticuerpos derivados de la infección natural.

A. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Aujeszky, también llamada pseudorabia porcina, está causada por *Suid herpesvirus 1* (SHV-1), un miembro de la subfamilia *Alphaherpesvirinae* y la familia *Herpesviridae*. El virus debe manipularse aplicando procedimientos de bioseguridad y biocontención adecuados, que vendrán determinados por un análisis del riesgo biológico (véase el Capítulo 1.1.4 *Bioseguridad y biocontención: norma para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones de los animales*). El virus infecta el sistema nervioso central y otros órganos, como el tracto respiratorio, en muchos mamíferos (como los perros, los gatos, el ganado bovino, los conejos, los zorros, los visones, etc.) excepto en el hombre y en los monos sin cola. Se asocia inicialmente con

los cerdos, que son sus hospedadores naturales, en los que permanece latente después de la recuperación clínica (excepto en los lechones de menos de 2 semanas de edad, que mueren de encefalitis). Como consecuencia, el cerdo es la única especie capaz de sobrevivir a una infección productiva y, por tanto, sirve de hospedador reservorio. En los cerdos, la gravedad de los signos clínicos depende de la edad del cerdo, de la vía de infección, de la virulencia de la cepa infectante y del estado inmunitario del animal. Los lechones de corta edad son muy susceptibles, y las tasas de mortalidad alcanzan el 100% durante las 2 primeras semanas de edad. Estos animales presentan signos de hipertermia y trastornos neurológicos graves: temblores, falta de coordinación, ataxia, nistagmo a opistótono y crisis epileptiformes intensas. Cuando los cerdos tienen más de 2 meses (cerdos en engorde-acabado), empiezan a predominar las formas respiratorias, con hipertermia, anorexia y signos respiratorios leves a graves: rinitis con estornudos y secreción nasal que puede avanzar a neumonía. La frecuencia de infecciones bacterianas secundarias es alta, en función del estado sanitario de la pira infectada. En este grupo de cerdos, la morbilidad puede alcanzar el 100%, pero en casos de ausencia de infecciones secundarias complicadas, la mortalidad oscila entre el 1 y el 2% (Pejsak y Trusczyński, 2006). Las cerdas y los verracos presentan principalmente signos respiratorios, pero en cerdas gestantes, el virus puede atravesar la placenta, infectar y matar a los fetos induciendo aborto, provocar el retorno al estro y hacer que nazcan fetos muertos. El virus se puede hallar en el esperma de los verracos infectados (van Rijn *et al.*, 2004). En otras especies susceptibles, la enfermedad es mortal, y el principal signo es un prurito intenso que hace que el animal roa o se rasque parte del cuerpo, normalmente la cabeza o los cuartos traseros, hasta que provoca una gran destrucción de tejido. Por este motivo, la enfermedad se denominaba anteriormente “picor furioso”.

Aparecen lesiones necróticas focales y encefalomieltis en el cerebro, el cerebelo, las glándulas adrenales y otras vísceras, como los pulmones, el hígado o el bazo. En los fetos o en lechones muy jóvenes, unas manchas blancas en el hígado son muy indicativas de la infección. En varios tejidos a menudo se observan lesiones intranucleares.

La enfermedad de Aujeszky es endémica en muchas partes del mundo, pero varios países han llevado a cabo programas de erradicación eficaces, como EE.UU., Canadá, Nueva Zelanda y muchos Estados Miembros de la Unión Europea.

La enfermedad se controla mediante la contención de las piaras infectadas y empleando vacunas y/o eliminando a los animales infectados de forma latente (Pejsak y Trusczyński, 2006). En varios países se ha aplicado o se aplica el sacrificio sanitario, normalmente cuando las explotaciones infectadas son pequeñas o cuando el riesgo para las explotaciones vecinas es muy alto en países libres de la enfermedad.

Aunque el aislamiento del virus de la enfermedad de Aujeszky o la detección del genoma vírico mediante la reacción en cadena de la polimerasa se emplean para el diagnóstico en caso de formas letales de la enfermedad de Aujeszky o de enfermedad clínica en los cerdos, para el diagnóstico de las formas latentes se precisan pruebas serológicas, así como tras la desaparición de los signos clínicos. Los animales afectados distintos de los suidos no viven lo suficiente como para producir una respuesta serológica notable. Las pruebas adecuadas para detectar cerdos infectados de forma subclínica o latente son las serológicas, sobre todo en el caso de la calificación del estado sanitario de los animales con fines de comercio internacional u otros fines.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la enfermedad de Aujeszky y su propósito

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Identificación del agente¹						
Aislamiento del virus	–	–	–	+++	–	–
PCR en tiempo real	–	+	+	+++	+	–

1 Se recomienda aplicar varios métodos de identificación del agente a la misma muestra clínica.

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Detección de respuesta inmunitaria						
Aglutinación por latex	+++	+++	+++	+	+++	+++
ELISA	+++	+++	+++	+	+++	+++
VN	+	+	+	+	+	+++

Clave: +++ = método recomendado para este propósito; ++ = método recomendado pero tiene limitaciones; + = método adecuado en muy pocas situaciones; – = no adecuado para este propósito
 PCR = reacción en cadena de la polimerasa; ELISA = enzimoimmunoanálisis; VN = neutralización del virus.

1. Identificación del agente

1.1. Aislamiento del virus

El diagnóstico de la enfermedad de Aujeszky puede confirmarse en los cerdos vivos mediante el aislamiento del virus en hisopos buco-faríngeos, nasales o de las amígdalas, o en muestras de cerdos muertos, o después de la aparición de signos clínicos tales como la encefalitis en los herbívoros o los carnívoros. Las muestras de encéfalo, amígdalas y pulmón son las más adecuadas para el aislamiento post-mortem del SHV-1. En el ganado bovino, la infección se caracteriza normalmente por la aparición de prurito, en cuyo caso puede ser necesario disponer de una muestra del correspondiente corte de la médula espinal para el aislamiento del virus. En los cerdos con la infección latente, el ganglio trigémino es el más apropiado para aislar el virus, aunque el virus latente no es, por lo general, infectante, a no ser que se reactive, en cuyo caso resulta difícil recuperarlo por medio del cultivo.

Las muestras de tejido se homogenizan en una solución salina normal o en un medio de cultivo celular con antibióticos. El método utilizado debe ser adecuado para la posterior prueba de diagnóstico. La cantidad de tejido homogenizado debe tener en cuenta una posible distribución no homogénea del virus. Se recomienda trabajar con un homogenado de tejido de alrededor del 10%. La suspensión que resulta se clarifica mediante la centrifugación a baja velocidad, a 900 **g** durante 10 minutos. El sobrenadante se usa para inocular cualquier sistema de cultivo celular que resulte sensible. Muchos tipos de líneas celulares o de cultivos celulares primarios son sensibles al SHV-1, pero se suele utilizar una línea celular de riñón de cerdo (PK-15 o SK6). El medio para el cultivo debe contener antibióticos (como: 200 UI/ml de penicilina; 100 µg/ml de estreptomycin; 100 µg/ml de polimixina; y 3 µg/ml de fungizona).

El SHV-1 produce un efecto citopático (ECP) que suele aparecer en 24–72 horas, pero el cultivo celular debe incubarse durante 5–7 días. La monocapa presenta acumulaciones de células refringentes, a las que sigue una separación completa de la placa de toda la capa celular. También aparecen sincitios, cuya forma y tamaño son variables. En caso de ausencia de ECP visible, se aconseja hacer un pase a otros cultivos. Se puede obtener una evidencia adicional mediante la tinción con hematoxilina y eosina de cultivos infectados en cubres para demostrar las inclusiones acidófilas intranucleares características de los herpesvirus con marginación de la cromatina. La identidad del virus debe confirmarse mediante la inmunofluorescencia, la inmunoperoxidasa, la neutralización con un antisuero específico siguiendo el método descrito en el apartado B.2.1 o la PCR.

El aislamiento del SHV-1 confirma la enfermedad de Aujeszky, pero la falta de aislamiento no garantiza la ausencia de infección.

1.2. Identificación del virus mediante la reacción en cadena de la polimerasa

La PCR puede utilizarse para identificar la presencia de genomas del SHV-1 en las secreciones o en las muestras de órganos. Muchos laboratorios han establecido protocolos eficaces, pero aún no existe un enfoque estandarizado que cuente con el consenso internacional

La técnica de la PCR se basa en la amplificación selectiva de una parte determinada del genoma usando dos cebadores localizados en cada uno de los extremos de la secuencia seleccionada. En un primer paso, se aísla el ADN completo por métodos estandarizados (por ejemplo, mediante la digestión con la proteinasa K y la extracción con fenol-cloroformo o mediante los kits comerciales de extracción de ADN. Las secuencias elegidas se pueden amplificar hasta un millón de veces mediante los ciclos de desnaturalización de ADN que originan moldes de ADN monocatenarios, mediante la hibridación de los cebadores, y mediante la síntesis de las secuencias complementarias utilizando una ADN polimerasa termoestable. Los cebadores se deben diseñar de modo que amplifiquen una secuencia que sea común a todas las cepas del SHV-1; por ejemplo, se han usado partes de los genes gB o gD, que codifican las glucoproteínas esenciales del virus (Mengeling *et al.*, 1992; Van Rijn *et al.*, 2004; Yoon *et al.*, 2006). Se han desarrollado PCR en tiempo real que permiten diferenciar los virus vacunales en los que se ha eliminado el gen de la gE, de los virus naturales, mediante la detección concreta de los genes de la gB y la gE (Ma *et al.*, 2008; Wernike *et al.*, 2014).

Se puede identificar el producto amplificado por su peso molecular, que se determina por su desplazamiento en geles de agarosa, y cuando es posible mediante su posterior confirmación mediante la secuenciación del producto amplificado. Entre las técnicas más recientes, están el uso de sondas fluorescentes ligadas a una acción de la exonucleasa, y el seguimiento en tiempo real de la evolución del producto, con lo que es posible la amplificación y la confirmación del ADN molde, aumentando de este modo la rapidez y especificidad de las PCR.

En todos los casos, la principal ventaja de la PCR es su rapidez en comparación con las técnicas convencionales de aislamiento del virus. Con los equipos más modernos, todo el proceso de identificación y confirmación se puede completar en un día. Sin embargo, debido a la naturaleza de la prueba, es necesario tomar muchas precauciones para evitar la contaminación de las pruebas con ADN extraño procedente de otras pruebas previas o de la contaminación general ambiental del laboratorio (véase el capítulo 1.1.9. *Pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación en los materiales biológicos de uso veterinario*). Esto puede reducir el valor de la prueba en muchos laboratorios, a menos que se evite la contaminación por ADN ambiental. El empleo de un control interno se recomienda para evitar falsos negativos, asegurando una eficiencia suficiente en la extracción de ADN y confirmando la ausencia de inhibidores de la PCR en cada muestra. En la práctica, pueden emplearse varios sistemas de detección de genes endógenos o exógenos (Hoffman *et al.*, 2009). Existen a la venta kits de esta prueba (Pol *et al.*, 2013).

2. Pruebas serológicas

La neutralización vírica (VN) ha sido reconocida como el método serológico de referencia (Moennig *et al.*, 1982), pero a efectos del diagnóstico general, se ha sustituido en gran medida por el enzimoimmunoanálisis (ELISA) porque este es adecuado para realizar análisis a gran escala (Moennig *et al.*, 1982). Las pruebas pueden realizarse con gran variedad de muestras (como suero, sangre total, leche, exudados musculares y papel de filtro), pero la de elección es el suero.

También se ha desarrollado una prueba de aglutinación en látex y puede emplearse para detectar anticuerpos. Se comercializan kits de diagnóstico (Schoenbaum *et al.*, 1990).

Las pruebas serológicas solo se aplican a los suidos, porque los demás animales (herbívoros o carnívoros) mueren demasiado rápido como para producir anticuerpos. En las zonas libres de la enfermedad, en las que no se vacuna a los cerdos, puede llevarse a cabo un estudio epidemiológico activo empleando kits de ELISA para la gB o gE o de aglutinación por latex. Dado que pueden detectarse anticuerpos entre los días 7 y 10 post-infección, estas pruebas serológicas también pueden emplearse en caso de sospecha de brote, para confirmar la infección en cerdos. En las zonas donde se vacunan los cerdos con vacunas en las que se ha eliminado el gen de la gE, los kits de ELISA para la gE permiten diferenciar entre cerdos infectados y vacunados (DIVA), pero para evaluar el nivel de inmunidad inducida por la vacunación, deben emplearse kits de ELISA para la gB, kits de aglutinación por latex o neutralización vírica.

Cualquier prueba serológica debe ser lo bastante sensible para dar un resultado positivo con el Suero Estándar de Referencia Internacional de la OIE o con un suero secundario calibrado. El suero de referencia se puede obtener del Laboratorio de Referencia de la OIE para la Enfermedad de Aujeszky, en Francia (véase la tabla de la parte 3 de este *Manual*). A efectos del comercio internacional, la prueba debería de ser lo bastante sensible

para detectar el suero estándar diluido a 1/2. Para autorizar el desplazamiento de cerdos de una zona en la que se emplea la vacuna en la que se ha eliminado el gen de la gE a una zona libre de la enfermedad, las pruebas serológicas deben permitir la detección de al menos la dilución de 1/8 en el caso del ELISA para la gE del suero estándar de referencia de la OIE, según indica la Comisión Europea (2008).

2.1. Neutralización del virus

En el cultivo celular, la prueba de la VN se puede realizar de varios modos, dependiendo de la duración de la incubación de las mezclas del virus con suero (por ejemplo, 1 hora a 37°C o 24 horas a 4°C) y de la presencia o ausencia del complemento. La mayoría de los laboratorios utilizan un período de reacción de 1 hora a 37°C en ausencia del complemento porque resulta fácil y rápido. No obstante, la sensibilidad se mejora aumentando el tiempo de incubación a 24 horas a 4°C, lo cual facilita la detección de unos niveles de anticuerpos 10–15 veces menores que los detectados por el método de 1 hora. En el caso del comercio internacional, el método debe ser validado para que sea lo suficientemente sensible para detectar el Suero Estándar de Referencia de la OIE a una dilución 1/2.

No se puede utilizar la prueba de VN para diferenciar entre los anticuerpos debidos a la vacunación y los debidos a una infección natural. Es una de las dos pruebas disponibles que cumplen con el requisito que la OIE establece en el capítulo del *Código Terrestre* cuando se refiere a “una prueba diagnóstica para el virus completo”.

i) Células

Se usan células susceptibles a la infección por el SHV-1; pueden ser líneas celulares (por ejemplo PK-15, SK6, MDBK) o cultivos celulares primarios o secundarios (por ejemplo, riñón porcino).

ii) Medio de cultivo celular

El medio depende del tipo de células. Por ejemplo, el medio para las células PK-15 es el medio mínimo esencial de Eagle (MEM) + un 10% de suero fetal bovino y antibióticos (100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina, o bien 50 µg/ml de gentamicina).

iii) Mantenimiento de las células

Las células se cultivan en recipientes para cultivos celulares de, por ejemplo, 75 cm². Se subcultivan semanalmente una o dos veces por tripsinización. En el caso de una tripsinización semanal, las células normalmente se cultivan en 50 ml de medio, con un índice de multiplicación de 5. En el caso de dos tripsinizaciones a la semana, las células se cultivan en 30 ml de medio, con un índice de multiplicación de 3.

Para la tripsinización, se elimina el medio de crecimiento una vez la monocapa celular está completa. La monocapa se lava con unos 5 ml de una solución recién descongelada de tripsina/ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (0,25%) en tampón isotónico. Se elimina el líquido de lavado y la preparación se lava de nuevo, dejando solo unas cuantas gotas de la solución de tripsina. Se coloca el recipiente en una incubadora a 37°C durante 5–10 minutos hasta que se separen las células. Una vez la monocapa se haya separado y las células estén bien aisladas, en el caso de dos pases a la semana se suspenden en 90 ml de medio de crecimiento, y esta suspensión se distribuye en tres frascos de 75 cm² para cultivo celular. En el caso de la tripsinización semanal, las células se suspenden en 150 ml de medio de crecimiento y la suspensión se distribuye en cinco frascos de 75 cm² para cultivo celular.

iv) Virus

Se mantiene a una temperatura de –65°C o inferior, o en forma liofilizada a 4°C, una cepa adecuada del SHV-1, como la cepa Kojnok o la cepa NIA-3.

v) Preparación de una suspensión reserva de virus

Se elimina el sobrenadante de un frasco de cultivo celular que contenga una monocapa en completa confluencia. Se añade 1 ml de una suspensión de virus de título conocido (aproximadamente 10⁷ DICT₅₀ [dosis que resulta infectiva en el 50% de los cultivos expuestos]/ml) y se incuba el frasco a 37°C±2°C durante 1 hora. Luego, se añaden 30 ml de medio de cultivo y se incuba de nuevo el frasco a 37°C±2°C. El frasco se examina frecuentemente hasta que presente cerca de un 75% de destrucción celular (después de unas 36–48 horas). A continuación, se congela a una temperatura de –65°C o inferior para romper las células.

Después se descongela el frasco y se agita vigorosamente. Se recoge el medio y se centrifuga a 1.500 g durante 15 minutos. El sobrenadante se distribuye en porciones (de unos 0,5 ml) en

tubos pequeños que se marcan (con la fecha y el virus de referencia) antes de almacenarlos a una temperatura de -65°C o inferior hasta su uso.

vi) Titulación de la suspensión reserva de virus

La titulación de la suspensión reserva de virus se realiza por el método de Reed y Muench o el de Karber, y el título se expresa por 50 μl y por ml.

La prueba de la VN requiere un suero control interno de calidad con un título conocido de anticuerpos neutralizantes frente al SHV-1 (que puede calibrarse contra un suero estándar internacional o un estándar secundario preparado a partir de dicho suero), y un suero control negativo (de un cerdo que no contenga anticuerpos específicos, por ejemplo de una pira que esté oficialmente libre de la enfermedad de Aujeszky). Los sueros problema deben de ser de calidad, estar claramente etiquetados, proceder de un origen conocido con historia clínica, almacenarse refrigerados en todo momento, estar libres de contaminación fúngica o bacteriana, no estar hemolizados y en presentar cantidad suficiente. El suero debe ser separado del coágulo sin retraso, para evitar la toxicidad.

Existen procedimientos cualitativos y cuantitativos para la prueba de de la VN, que se describen a continuación.

2.1.1. Técnica cualitativa

- i) Se destruye el complemento del suero calentando en un baño de agua a $56-59^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos.
- ii) Cada muestra de suero sin diluir se coloca en dos a tres pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos para cultivo celular, poniendo 50 μl por pocillo. Cada suero también puede diluirse a la $\frac{1}{2}$ en el MEM, antes de colocarse en dos pocillos más.
- iii) A cada pocillo se añaden 50 μl de una suspensión del virus que contenga 100 DICT₅₀ (o 2×10^3 DICT₅₀/ml), obtenida mediante dilución con MEM de la suspensión reserva de virus de título conocido.
- iv) Se agita la placa suavemente y se coloca en una incubadora durante 1 hora a 37°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) (la presencia de un 5% de CO_2 es opcional).
- v) Se añaden a cada pocillo 150 μl de suspensión celular que contenga aproximadamente 150.000 células/ml.
- vi) La placa se cubre (para la incubación en CO_2) o se sella cuidadosamente por sus bordes con un plástico (para la incubación en aire). La placa se agita suavemente para favorecer una distribución uniforme de las células en el fondo de los pocillos, y se coloca en la incubadora a 37°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) (la presencia de CO_2 es opcional), durante 3–5 días.
- vii) *Controles:* cada placa debe incluir los siguientes controles:

a) Virus control

Para comprobar la cantidad de virus realmente usada en la prueba. La dosis de virus usada para la neutralización (diana vírica con una titulación de 100 DICT₅₀/50 μl) se diluye 1/10, 1/100 y 1/1.000 con MEM. Se añaden 50 μl de cada dilución en al menos cuatro pocillos, a los que se añaden 50 μl de medio antes de incubar los pocillos durante 1 hora a 37°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$). La suspensión celular se añade del mismo modo que para el suero analizado.

b) Células control

En al menos dos pocillos se colocan 150 μl de suspensión celular y 100 μl de medio.

c) Suero control positivo

Se usa un suero de título conocido de anticuerpos neutralizantes frente al SHV-1. Se preparan cinco diluciones del mismo modo que para el suero analizado: una dilución que corresponda al título del suero, diluciones dobles y cuádruples, y diluciones a $\frac{1}{2}$ y $\frac{1}{4}$ (equivalente a T, T/2, T/4, 2T y 4T, donde T es el título del suero, es decir, suero sin diluir para la prueba cualitativa). A 50 μl de las diluciones de suero control positivo se añaden 50 μl de la suspensión del virus que contiene 100 DICT₅₀/50 μl . Los pocillos se incuban y se añade la suspensión celular como en el caso de los sueros analizados.

- d) Suero control
Tiene como objeto comprobar la ausencia de un efecto tóxico sobre las células debida a los sueros. Los pocillos que contienen 50 µl de cada suero se incuban durante 1 hora a 37°C en presencia de 50 µl de medio. Luego se añaden 150 µl de suspensión celular como en el caso de los sueros analizados.
- e) Suero control negativo
Se realiza como en el caso de los sueros analizados.
- viii) *Lectura de los resultados:* Para examinar el efecto tóxico y el ECP en los pocillos después de 3 a 5 días, se utiliza un microscopio de imagen invertida (x 100). Para que la prueba sea válida, los controles deben dar los siguientes resultados:
- a) Virus control
El título de la suspensión vírica debe estar entre 30 y 300 DICT₅₀/50 µl.
- b) Células control
La monocapa de células debe aparecer intacta
- c) Suero control positivo
El título obtenido debe coincidir con el previsto, dentro de una dilución.
- d) Suero control
El examen para observar el ECP debe tener en cuenta un posible efecto tóxico sobre las células.
- e) Suero control negativo
Debe evidenciarse el ECP.
- ix) En los sueros analizados pueden encontrarse los siguientes resultados:
- a) presencia de ECP en tres pocillos = resultado negativo;
- b) ausencia de ECP en tres pocillos a los 3 días = resultado positivo;
- c) presencia de ECP en un pocillo pero no en los otros dos = resultado inconcluyente, la prueba debe repetirse;
- d) pequeñas calvas indicando ECP a los 3 días = resultado inconcluyente, la prueba debe repetirse;
- e) toxicidad en los pocillos de suero control y problema = resultado no concluyente, la prueba debe repetirse (sustituir el medio por uno fresco después de 16 horas de incubación puede reducir la toxicidad sin afectar al título del anticuerpo específico). Las placas se pueden leer hasta el día 5 de incubación.
- f) Si el suero se diluyó inicialmente a 1/2 y se distribuyó en dos pocillos, se considera positivo si no hay ECP en uno de ambos pocillos, y se recomienda encarecidamente repetir la prueba empleando la técnica cuantitativa. El diluir el suero a 1/2 puede impedir el efecto de toxicidad de los sueros problema.
- x) *Interpretación de los resultados:* Esta prueba es capaz de detectar la presencia o la ausencia de los anticuerpos neutralizantes frente al SHV-1. No permite distinguir entre los animales vacunados y los infectados.
- La técnica descrita (VN durante 1 hora a 37°C) puede dar falsos negativos y falsos positivos. Se puede aumentar su sensibilidad (reduciendo la aparición de falsos negativos) adoptando un método de neutralización de 24 horas de contacto entre el virus y el suero a 4°C, antes de añadir las células.
- Una técnica cualitativa de este tipo, en la que se utilizan muestras de suero sin diluir (dilución final 1/2), puede originar en algunos casos un falso positivo debido a la neutralización inespecífica del virus. Este problema puede solucionarse realizando una prueba confirmativa mediante la técnica cuantitativa (ver el apartado B.2.1.2. abajo).

Las muestras que den resultados inconcluyentes pueden analizarse mediante otra técnica, una que tenga una mayor sensibilidad, como un ELISA, o bien se puede optar por volver a extraer sangre del animal para confirmar el resultado.

2.1.2. Técnica cuantitativa

Es similar al procedimiento cualitativo, pero cada suero se utiliza tanto sin diluir como en diluciones seriadas. Dependiendo de la precisión deseada, del propósito de la prueba y del título esperado, se usan dos pocillos para cada dilución de suero, y un intervalo de diluciones adecuado para la finalidad de la prueba. El procedimiento siguiente describe la prueba para una dilución inicial máxima de 1/16. Es posible alcanzar títulos más altos empleando más pocillos (como los pocillos A1 a A12 para una dilución 1/256).

- i) Se destruye el complemento de las muestras de suero mediante el calentamiento en un baño de agua a 56-59°C durante 30 minutos.
- ii) Se añaden 75 µl de MEM al pocillo A2 y 50 µl de MEM a los pocillos A1 y a los pocillos A3 a A6 de una placa de microtitulación para cultivos celulares de 96 pocillos y se sigue, con fines de comparación, con los pocillos de las filas B, C, etc. con muestras de otros sueros.
- iii) Al pocillo A2 se añaden 75 µl de una muestra de suero no diluido, y se sigue con los pocillos de las filas B, C, etc., con muestras de otros sueros.
- iv) Usando una pipeta múltiple, se mezcla el contenido de los pocillos de la columna 2, y se transfieren 50 µl a las columnas 1 y 3, y así hasta la columna 6 o más hasta una fila predeterminada, usando las mismas boquillas de la pipeta. Las porciones de 50 µl que quedan después de la última fila se desechan.
- v) Se añaden a cada pocillo de las columnas 2 a 650 µl de suspensión del virus que contenga 100 DICT₅₀ (o 2×10^3 DICT₅₀/ml), obtenida por dilución de la suspensión reserva del virus de título conocido con MEM. No se añade virus a los pocillos de la columna 1, puesto que esta es una columna control de las muestras de suero.
- vi) La placa se agita y se deja en una incubadora durante 1 hora a 37°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) (5% de CO₂ opcional).
- vii) Se añaden a cada pocillo 150 µl de suspensión celular que contenga unas 150 000 células/ml.
- viii) La placa se cubre (para la incubación en CO₂), o bien se sella con plástico bien pegado por todo el contorno de la placa (para la incubación en aire). La placa se agita suavemente para obtener una distribución uniforme de las células en el fondo de los pocillos, y se deja en la incubadora a 37°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) (CO₂ opcional) durante 3–5 días.
- ix) Se establecen los controles de la misma forma que para la técnica cualitativa.
- x) *Lectura de los resultados:* El título neutralizante de un suero se expresa como el denominador de la dilución más alta que lleva a cabo una neutralización completa del ECP en el 50% de los pocillos. La neutralización se considera positiva a cualquier dilución (incluso sin diluir, equivalente a una dilución final de 1/2). Si el suero solo muestra la neutralización cuando no está diluido (con crecimiento del virus y aparición del ECP a dilución 1/2 y subsiguientes diluciones), se aconseja utilizar las pruebas alternativas (ELISA o aglutinación en látex) para confirmar el resultado, o solicitar otra muestra del animal, al menos 8 días después de la toma de la primera.

2.2. Enzimoimmunoanálisis

La sensibilidad de las técnicas ELISA suele ser superior a la de la prueba de NV utilizando la neutralización sin complemento durante 1 hora. Algunos sueros débilmente positivos son detectados más fácilmente mediante las pruebas de tipo VN cuando se utiliza la neutralización durante 24 horas, mientras que otros resultan más fáciles de detectar mediante las técnicas ELISA.

Para detectar anticuerpos, los kits comerciales de ELISA utilizan técnicas indirectas o competitivas. Difieren en el modo de preparación del antígeno, del conjugado o del substrato, y en el tiempo de incubación y en la interpretación de los resultados. Una ventaja general es que permiten un procesamiento rápido de un gran número de muestras, que puede automatizarse, y los resultados pueden analizarse por ordenador. Algunos de estos kits comerciales permiten diferenciar entre los animales vacunados y los infectados naturalmente cuando se utilizan con una vacuna 'a juego' (Eloit *et al.*, 1989; Van Oirschot *et al.*, 1986). Como alternativa, se pueden adoptar los protocolos ELISA no comercializados (Toma y Eloit, 1986) con tal de que sean capaces de detectar como positivo el Suero

Estándar de Referencia Internacional de la OIE a una dilución de 1/2 (sensibilidad mínima a efectos de comercio internacional). Se recomienda usar un kit comercial o casero que haya sido validado por este estándar o un estándar secundario preparado respecto al Estándar de Referencia Internacional mediante pruebas externas de control de calidad realizadas por un laboratorio independiente. A continuación se presenta un protocolo adecuado de prueba para los anticuerpos frente a los virus completos (Toma y Eloit, 1986).

2.2.1. Preparación del antígeno

- i) Se usa una línea celular sensible a SHV-1, como la PK-15 o células testiculares de cerdo fetal. Debe estar libre de virus exógenos, como el virus de la diarrea vírica bovina. Las células deben dividirse para el subcultivo y sembrarse en recipientes nuevos de 75 cm² el día antes de la inoculación. Para cubrir el cultivo, se usa un medio adecuado como el MEM, sin suero.
- ii) A lo largo del procedimiento se procesan en paralelo recipientes inoculados con el virus y otros no inoculados como control. Se usa una cepa SHV-1 apropiada y bien caracterizada, como la cepa Kojnock. Cuando se desarrolla una monocapa celular confluyente (en torno a las 24 horas después de la siembra), se inocula con 10⁸ DICT₅₀ de SHV-1 en 5 ml de medio; y se añaden 5 ml de medio (sin el virus) a los recipientes control. Los cultivos se dejan 30 minutos a 37°C para que se produzca la adsorción, y luego se recubren con 20 ml de medio.
- iii) En el momento que comienza a aparecer el ECP, se retira el medio sobrenadante y se añaden 4 ml de una solución de KCl 4 mM y perlas de vidrio. Los frascos se agitan suavemente para separar las células.
- iv) Las células se lavan tres veces mediante centrifugación a 770 **g** en KCl 4 mM. El precipitado se resuspende en KCl 4 mM con Triton X-100 al 0,2% (1 ml por recipiente) mediante 60 golpes en un homogenizador de vidrio.
- v) El homogenizado celular se coloca sobre una solución de sacarosa 0,25 mM en KCl 4 mM y se centrifuga durante 10 minutos a 770 **g**.
- vi) El precipitado se resuspende en tampón de dilución del antígeno, pH 9,6 (Tris 0,1 M, EDTA 2 mM, NaCl 0,15 mM) hasta 1/50 del volumen original del medio de cultivo. Después puede guardarse a -70°C en pequeñas alícuotas. En esta forma el antígeno es estable durante 2 años.

2.2.2. Recubrimiento de las placas de microtitulación

- i) El antígeno vírico y el control (sin virus) se diluyen en tampón de dilución, pH 9,6 (ver arriba) hasta una dilución predeterminada en titulaciones de doble entrada por el método del tablero de ajedrez.
- ii) En cada pocillo de una placa para ELISA de 96 pocillos se ponen 200 µl de antígeno, recubriendo las filas alternativas con antígeno SHV-1 positivo y con control de antígeno. Se incuba durante 18 horas a 4°C.
- iii) Las placas se lavan tres veces con solución de lavado (Tween 20 a 0,5 ml/litro).
- iv) Las placas recubiertas se guardan a -20°C o a -70°C. Son estables durante varios meses.

2.2.3. Procedimiento analítico

- i) Las muestras de los sueros problema se diluyen a 1/30 en tampón PBS/Tween, pH 7,2 (NaCl 137 mM, tampón fosfato 9,5 mM, Tween 20 a 0,5 ml/litro)
- ii) A los pocillos recubiertos con antígeno vírico y con control de antígeno se añaden las muestras diluidas y se incuba a 37°C durante 30 minutos.
- iii) Las placas se lavan tres veces con solución de lavado (Tween 20 a 0,5 ml/litro).
- iv) Se añade a todos los pocillos el conjugado proteína A/peroxidasa a una dilución predeterminada en tampón PBS/Tween, pH 7,2 (ver arriba) suplementado con la fracción V de albúmina de suero bovino (10 g/litro), y se incuban las placas a 37°C durante 30 minutos.
- v) Las placas se lavan tres veces con solución de lavado (Tween 20 a 0,5 ml/litro).
- vi) Se añade a cada pocillo de la placa una mezcla apropiada de cromógeno/substrato, tal como tetrametilbenzidina (TMB)/peróxido de hidrógeno.
- vii) La reacción se detiene con ácido sulfúrico 2 mM. Se lee la absorbancia a 492 nm.

La prueba debe validarse por completo usando sueros control negativos y positivos, y debe calibrarse frente al Suero Estándar de Referencia Internacional de la OIE. Se recomienda encarecidamente llevar a cabo un control por lotes en cada lote de la prueba, con el fin de determinar la sensibilidad y la especificidad respecto a los criterios de validación iniciales (deben establecerse los criterios de aceptación o rechazo del lote). Para los análisis de rutina, todas las pruebas deben incluir controles internos positivos y negativos, incluyendo al menos una muestra débilmente positiva que, cuando se diluya a la dilución apropiada para la prueba, tenga una actividad equivalente a la dilución 1/2 del Suero Estándar de Referencia Internacional de la OIE. También se utilizan controles internos para realizar un seguimiento de la sensibilidad, la especificidad y la reproducibilidad de la prueba a lo largo del tiempo. Para más detalles, véase Toma y Eloit, 1986 y el Capítulo 1.1.6 *Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas*. Los equipos comerciales de ELISA también tienen que ser validados en el rango en el que van a ser usados.

Además de para los sueros problema, los métodos ELISA se pueden adaptar al análisis de muestras combinadas de sueros, en disco de papel de filtro que han sido impregnados de una pequeña cantidad de sangre obtenida por punción de una vena superficial (Banks, 1985; Toma *et al.*, 1986), o exudados musculares (Le Potier *et al.*, 1998). Estas técnicas resultan adecuadas para recoger muestras de sangre en un número elevado de cerdos (Vannier *et al.*, 2007). Los discos se secan al aire antes de enviarlos al laboratorio. La sensibilidad analítica podría ser inferior a la de un ELISA estándar debido al tipo de muestra o a una dilución inevitable de la muestra. Por lo tanto, el uso de un ELISA adaptado es más adecuado para el análisis a nivel de población que para el análisis individual (por ejemplo, el que se realiza antes de un desplazamiento de los animales), a no ser que un estudio de validación haya demostrado que la sensibilidad analítica es comparable a la del ELISA estándar.

Varias autoridades responsables del control han definido los requisitos para la detección de los anticuerpos frente a gE mediante ELISA en cerdos destinados al sacrificio, que van a ser introducidos en zonas libres de la enfermedad de Aujeszky. Por ejemplo, en la Unión Europea, los kits de ELISA gE deben permitir detectar una actividad al menos equivalente a una dilución 1/8 del Suero de Referencia Estándar Internacional de la OIE (Comisión Europea, 2008). El *Código Terrestre* de la OIE especifica las circunstancias en las que pueden utilizarse las pruebas específicas para gE. Las técnicas ELISA para gE también se pueden adaptar al análisis de sangre sobre discos de papel de filtro, dependiendo de su sensibilidad.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

1. Antecedentes

1.1. Fundamentos y uso previsto del producto

La enfermedad de Aujeszky se puede controlar usando vacunas que contienen virus vivos modificados o antígenos víricos inactivados. Además, estas vacunas convencionales se han suplementado con vacunas vivas recombinantes derivadas de SHV-1 cuyo ADN presenta genes eliminados o con vacunas vivas de SHV-1 con supresiones naturales. Estas vacunas, denominadas vacunas marcadoras o DIVA, están hechas con un virus que carece de una glucoproteína específica (normalmente la gE, aunque también se han descrito vacunas que carecen de la gG o la gC, así como vacunas con múltiples supresiones²). Al menos una vacuna disponible comercialmente tiene supresiones dobles. Estas vacunas DIVA con genes eliminados tienen una ventaja respecto a las vacunas convencionales con virus completo, y es que con las primeras es posible distinguir a los animales infectados de los vacunados no infectados. Esto se hace mediante las pruebas para anticuerpos dirigidos contra la proteína codificada por el gen eliminado, que estarán ausentes en los cerdos no infectados y vacunados con vacunas DIVA pero que estarán presentes en los cerdos que tienen la infección natural. Por tanto, en los países con cerdos infectados, donde se planea la erradicación de la enfermedad de Aujeszky, estas vacunas DIVA son las de elección (Pensaert *et al.*, 2004). Se describen las normas estándar aplicables a la producción de vacunas con virus vivos e inactivados. En lo que respecta a las vacunas DIVA, las pruebas deben incluir la demostración de la ausencia de una respuesta serológica a la proteína codificada por el gen eliminado en los cerdos vacunados, y además, la demostración de la respuesta a la misma proteína en los cerdos vacunados que están infectados por el virus natural.

2 Hace varios años se cambió la nomenclatura de los genes, pero la denominación tradicional aún persiste en la bibliografía. La equivalencia entre la nomenclatura tradicional y la nueva es la siguiente: gII = gB; gIII = gC; gp50 = gD; gl = gE; gX = gG; gp63 = gl. Téngase en cuenta que es posible que ciertos kits serológicos comerciales conserven la nomenclatura tradicional.

Otras vacunas son inactivadas y están formadas por subunidades víricas adyuvantadas de glucoproteínas purificadas concentradas inmunógenas (excepto la gE) que permiten diferenciar entre cerdos vacunados e infectados.

Las directrices para la producción de vacunas veterinarias se presentan en el capítulo 1.1.8. *Principios de producción de vacunas veterinarias*. Las normas dadas aquí y en el capítulo 1.1.8 son de carácter general y se pueden suplementar con requisitos nacionales y regionales.

2. Descripción de la producción y requisitos mínimos para las vacunas convencionales

2.1. Características del inóculo

2.1.1. Características biológicas

Las vacunas se producen mediante un sistema de lotes de inóculo en los que se prepara un inóculo de virus inicial de siembra (MSV) a partir de una cepa adecuada del virus de la enfermedad de Aujeszky. Para la producción de las vacunas se usan varias cepas. En una vacuna inactivada el antígeno puede ser una de las muchas cepas de tipo natural, o el virus Bucharest con supresiones naturales. En las vacunas vivas convencionales con el virus modificado, se utilizan muchas cepas, como la Bartha, o se obtienen de la cepa original de Aujeszky o de otras cepas naturales, como la cepa NIA-3 (Marchioli *et al.*, 1987; McFerran & Dow, 1975; Van Oirschot *et al.*, 1990; Visser & Luticken, 1988).

Se recomienda que, para diferenciar entre los animales vacunados y los infectados, se utilicen cepas con supresiones.

En la elaboración del MSV se debe realizar una prueba de identidad del virus (utilizando una prueba de anticuerpo fluorescente, una prueba de neutralización [método del suero constante/virus decreciente], o cualquier otra prueba de identidad adecuada).

2.1.2. Criterios de calidad (esterilidad, pureza, ausencia de agentes extraños)

La mayor parte de las líneas celulares que se usan para propagar el SHV-1 son líneas continuas, como la línea PK-15. Se establece una reserva células original (*master cell stock*-MCS) con un número determinado de pases. El MCS y el número más alto de pases (MCS x n) que se usa en la preparación de un producto biológico se detalla en un Diseño de Producción. Tanto el MCS como el MCS x n se controlan de varios modos para caracterizar la línea celular y para asegurar que está libre de agentes exógenos. Generalmente, los agentes extraños que hay que suprimir aparecen definidos en las monografías o en las directrices (por ej. la Farmacopea Europea, el Código de Regulaciones Federales de EE.UU., las directrices de la Unión Europea, etc.). En general, el tipo de agente que se ha examinar se basa en el análisis del riesgo, dependiendo del historial de la cepa vírica y de las células de las que se ha aislado la cepa vacunal y de aquellas en las que se ha cultivado. El MCS se debe controlar en lo que respecta a la especie original. Deben examinarse un mínimo de 50 células mitóticas tanto en el MCS como al nivel de pases MCS x n. El número modal en el MCS x n no debe superar el 15% del número modal del MCS. Cualquier marcador cromosómico en el MCS debe estar también presente después del número más alto de pases celulares.

Si existe evidencia de que la línea celular puede inducir daño en la especie en la cual se va a aplicar el producto, se prueba la capacidad tumoral y la oncogenicidad de la línea celular.

Debe demostrarse que tanto el MSV como el MCS están libres de micoplasmas, bacterias, hongos, virus citopatógenos o hemadsorbentes, parvovirus porcino, pestivirus ovinos o bovinos citopáticos o no citopáticos y otros agentes extraños, como circovirus, mediante cultivo y pruebas de inmunofluorescencia u otras, como la PCR.

2.2. Método de fabricación

2.2.1. Procedimiento

Solo pueden emplearse como inóculos para un producto vacunal los MSV que se haya demostrado que son puros, inocuos e inmunógenos. Se propagan células del MCS en distintos medios de cultivo. Todos los lotes de vacuna deben proceder de los pases uno a veinte del MCS.

2.2.2. Controles durante el proceso

Es necesario llevar a cabo pruebas en cada paso crítico del proceso de fabricación. Las pruebas control también se llevan a cabo con productos intermedios con el fin de verificar la constancia del proceso de producción y del producto final.

2.2.3. Pruebas en lotes de producto final

Es fundamental diferenciar las pruebas que se realizan de forma sistemática para aprobar lotes de producto final, de las que se realizan para definir las propiedades biológicas de una vacuna. Las pruebas que se llevan a cabo para aprobar lotes no son las mismas que las que se realizan solo una vez para determinar la inocuidad y la eficacia de una vacuna. Los controles para la aprobación de lotes siempre son pruebas a corto plazo, lo más baratas posible, y en cerdos no siempre se realizan. Su objetivo es principalmente comprobar la reproducibilidad de la calidad del producto final, que tiene que concordar con la calidad inicialmente definida en la solicitud de autorización de comercialización.

i) Esterilidad y pureza

Debe realizarse pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación (véase el Capítulo 1.1.9 y el apartado C.2.1.2 de este capítulo).

En cada lote de vacunas de SHV-1 debe comprobarse si hay virus extraños. Empleando una cantidad mínima de un antisuero monoespecífico, la cepa vacunal viva se neutraliza y se inocula en cultivos celulares que se sepa que son sensibles a virus patógenos para los cerdos. No deben detectarse ECP ni agentes hemadsorbentes. Las vacunas tienen que estar libres de pestivirus.

ii) Inactivación

En el caso de las vacunas inactivadas, la inactivación debe comprobarse empleando dos pases en el mismo tipo de cultivo celular, como se hace para la producción de la vacuna. Pueden realizarse pruebas vacunando animales susceptibles, como los conejos.

iii) Identidad

Cuando sea necesario, debe realizarse una prueba específica para la identificación vírica.

iv) Inocuidad

Para la liberación de los lotes, muchas autoridades reguladoras no exigen pruebas de inocuidad en las especies de destino. Cuando se exigen, los procedimientos estándar deben ser estadísticamente relevantes e ir dirigidos al menor número de animales necesario para la aprobación correspondiente por parte de las autoridades reguladoras.

v) Potencia del lote

A potencia de la vacuna debe demostrarse mediante un método adecuado, cuyos resultados deben correlacionarse con las pruebas de eficacia descritas anteriormente.

En este tipo de prueba, lo más difícil es determinar un umbral de aceptabilidad para emplear o rechazar el lote según los resultados obtenidos.

Deben realizarse pruebas de contenido vírico empleando como mínimo uno de cada tres recipientes. Debe determinarse el título vírico de la vacuna debe determinarse y normalmente no debe ser superior a 1/10 de la dosis a la cual se ha demostrado que la vacuna es inocua, y no inferior al título mínimo de aprobación.

vi) Conservantes

Si no se incluye ningún conservante en el producto final, el fabricante debe demostrar que el producto sigue siendo aceptable durante el periodo recomendado de uso tras abrir el vial.

Debe demostrarse la eficacia de los conservantes en recipientes multidosis. Deben comprobarse la concentración del conservante en la vacuna final envasada y su persistencia a lo largo del periodo de validez.

vii) Precauciones (peligros)

Debe indicarse toda la información sobre las posibles reacciones adversas inducidas por la vacuna. Debe indicarse todo posible riesgo para la salud humana en caso de que el operario se inyecte accidentalmente una pequeña cantidad del producto. El fabricante debe indicar todas las condiciones de uso de la vacuna: mezclado, reconstitución, almacenaje, asepsia, longitud de la aguja, vía de administración y estado sanitario de los animales vacunados.

2.2.4. Pruebas de estabilidad

Deben realizarse pruebas para comprobar la caducidad propuesta por el fabricante. Estas pruebas deben estar basadas siempre en estudios de tiempo real; deben hacerse en un número suficiente de lotes (al menos tres) que se produzcan siguiendo el proceso de producción descrito y en productos almacenados en el recipiente final, y normalmente se trata de pruebas sobre la estabilidad biológica y fisicoquímica. El fabricante debe aportar los resultados de los análisis que apoyan la caducidad propuesta en todas las condiciones de almacenamiento previstas. Por lo general, la caducidad propuesta corresponde al período en que el producto se mantiene estable menos tres meses.

2.3. Requisitos para la autorización

2.3.1. Requisitos de inocuidad

Se deben examinar las reacciones locales y generales. Cuando se aplica una vacuna viva, es necesario diferenciar las propiedades exactas de seguridad de la cepa vacunal de las del producto final si este contiene un adyuvante.

Deben utilizarse criterios objetivos y cuantificables para detectar y medir las reacciones adversas; entre dichos criterios están los cambios de temperatura, la ganancia de peso, el tamaño de la camada, el rendimiento reproductivo, etc., de los grupos vacunados y los de control. Las pruebas deben realizarse mediante la administración de la vacuna a los cerdos a la dosis recomendada y siguiendo las vías de administración recomendadas.

En general, la inocuidad se comprueba inicialmente en condiciones experimentales, siguiendo los requisitos del Capítulo 7.8 del *Código Terrestre* de la OIE: *Utilización de animales en investigación y educación*. Cuando se conocen los resultados de esta prueba preliminar, es necesario incrementar el número de animales vacunados para evaluar la inocuidad de la vacuna en condiciones prácticas.

i) Pruebas de laboratorio

Todas las pruebas se deben realizar en cerdos que no tengan anticuerpos contra el virus de la enfermedad de Aujeszky o contra una subunidad del virus.

a. Efectos generales

1. Vacunas vivas

Las pruebas intranasales y la vacunación de lechones de 3–5 días son muy útiles para determinar el grado de inocuidad de una vacuna. Deben utilizarse al menos cinco lechones.

En el caso de las vacunas vivas, también resulta importante determinar las propiedades de una vacuna en los animales en los que se va a aplicar en condiciones normales y a la edad más temprana que se pretende vacunar; por ejemplo, en los cerdos para cebo, que normalmente se vacunan cuando tienen entre 9 y 12 semanas de edad, y en las cerdas gestantes hay que determinar cuándo recomienda el fabricante emplear la vacuna y si este uso está autorizado. Después de la vacunación, no se deberían observar signos clínicos, como reacciones térmicas significativas (deben registrarse los datos antes de la vacunación y después de forma pautada, por ejemplo, a las 6, 24 y 48 horas, y después a diario durante el período de observación). Estas pruebas tienen que realizarse en al menos diez cerdos vacunados, utilizando cinco cerdos no vacunados como control.

Se debe examinar la reversión a la virulencia después de pases seriados. La vacunación inicial se hace por la vía intranasal. Se realiza al menos una serie de

cuatro pases en lechones. En cada pase se deben utilizar no menos de dos animales susceptibles.

El objeto de estas pruebas es determinar la estabilidad genética de las cepas de la vacuna viva. Las pruebas son menos necesarias cuando se emplea una cepa viva modificada genéticamente, en especial si se produce por eliminación de genes.

Se recomienda comprobar la posible excreción de la cepa vacunal. A estos efectos, un mínimo de 14 lechones de 3–4 semanas han de recibir una dosis individual de la vacuna por la vía recomendada y en el lugar adecuado (excepto en el caso de las vacunas administradas por vía intranasal). Se mantienen cuatro lechones no vacunados como control. Se realizan pruebas individuales de sensibilidad apropiada para detectar el virus en las secreciones nasales y orales de los cerdos vacunados que vivan juntos del modo siguiente: se toman diariamente hisopos nasales y orales desde el día anterior a la vacunación hasta 10 días después de la misma. Para fines de erradicación, no son recomendables las cepas vacunales que se aislen a partir de las secreciones nasales u orales obtenidas de cerdos a los que la vacuna se haya administrado por vía parenteral.

La capacidad de la cepa vacunal de la enfermedad de Aujeszky de transmitirse de un cerdo vacunado a otro no vacunado (difusión lateral) debe comprobarse empleando la vía de administración recomendada que presente el mayor riesgo de transmisión (excepto si las vacunas se administran por vía intranasal). Como este fenómeno es difícil de detectar, se hace necesaria la repetición (cuatro veces) de las pruebas. Cada vez se deben utilizar cuatro lechones para la vacunación, y al día siguiente deben ponerse en contacto con dos lechones no vacunados. También puede resultar necesario examinar la difusión de la cepa a otras especies no relacionadas que puedan ser susceptibles a la cepa vacunal.

Se comprueba qué efectos generales tienen las vacunas vivas atenuadas administrando diez veces la dosis de trabajo a lechones de 5–10 días de edad. La administración de esta superdosis hace posible detectar las reacciones que no se producen en condiciones normales de uso. Tales reacciones pueden aparecer accidentalmente cuando se vacunan muchos animales. Si las vacunas se administran por vía intranasal, el fabricante debe especificar con claridad que la vacuna se transmitirá de los cerdos vacunados a los no vacunados.

2. Vacunas inactivadas

En el caso de los cerdos de engorde y de las cerdas, es importante probar las vacunas inactivadas en los animales en los que se ha de aplicar en condiciones normales cuando esta aplicación es la pretendida por el fabricante y está autorizado (Farmacopea Europea, 2008; Vannier *et al.*, 2007). Tal como se ha descrito antes, es fundamental utilizar criterios objetivos y cuantificables para detectar y medir las reacciones adversas en los grupos vacunados y los grupos control, como los cambios de temperatura, la ganancia de peso, el tamaño de las camadas, el rendimiento reproductor, etc. Las pruebas deben realizarse mediante la administración de la vacuna a la dosis recomendada y por la vía apropiada de inoculación a los cerdos en los que se ha de aplicar.

Los cerdos y las cerdas se suelen mantener en observación hasta que haya desaparecido cualquier indicio de reacción a la vacuna. El período de observación no debe ser inferior a 14 días desde la administración. Dicho período se prolonga cuando, por ejemplo, se usa la vacuna en cerdas gestantes y resulta necesario determinar los posibles efectos de la misma en la capacidad reproductora. En tal caso, el período de observación dura toda la gestación.

Las autoridades de control generalmente exigen una vacunación con dosis doble, de modo que las reacciones adversas, que pueden estar por debajo del límite de detección cuando se administra una dosis simple, resulten más fácilmente detectadas.

b. Reacciones locales

Las reacciones locales se asocian a menudo con el uso de vacunas inactivadas, ya que estos efectos colaterales pueden inducirse por la presencia de un adyuvante, en particular por los adyuvantes oleosos (Vannier, 1986). No obstante, algunas vacunas

vivas contra la enfermedad de Aujeszky se mezclan con adyuvantes diferentes, lo que supone un cambio con respecto a lo que se observó en el pasado.

Las reacciones locales son fundamentalmente inflamatorias y más o menos complicadas (necróticas o supurativas) dependiendo de la naturaleza del adyuvante usado y de las condiciones asépticas de la vacunación. Los adyuvantes oleosos pueden provocar varios efectos, que incluyen la degeneración muscular, granulomas, fibrosis y formación de abscesos. Además de la naturaleza del aceite usado (la intensidad de la reacción se reduce cuando en la vacuna se emplean aceites metabolizables), el tipo de la emulsión utilizada (agua/aceite, aceite/agua, agua/aceite/agua) provoca un mayor o menor aumento de estas reacciones. En consecuencia, es necesario observar el punto de inoculación no solo desde fuera, sino también mediante la disección después del sacrificio, en especial en el caso de los cerdos de engorde.

ii) Ensayos de campo

Los ensayos de campo son necesarios para determinar la inocuidad de la vacuna contra la enfermedad de Aujeszky en un gran número de cerdos o cerdas. En Europa (Farmacopea Europea, 2008), las pruebas se deben realizar en cada categoría de animales a los que se pretenda vacunar (cerdas, cerdos de engorde). Se usan al menos tres grupos con no menos de 20 animales cada grupo, y el correspondiente grupo control de al menos 10 animales. En el momento de la vacunación, y 6, 24 y 48 horas después, se mide la temperatura rectal de cada animal. En el sacrificio, se debe comprobar si en el punto de inyección hay reacciones locales. Si la vacuna se usa en las cerdas, debe registrarse la capacidad reproductora. Los ensayos de campo se complementan con pruebas de laboratorio sobre la existencia de una correlación entre la eficacia y la potencia de la vacuna.

2.3.2. Requisitos de eficacia

i) Pruebas de laboratorio

Todas las pruebas deben hacerse con cerdos que no tengan anticuerpos contra el virus de la enfermedad de Aujeszky o contra una subunidad del virus, aunque algunas pruebas se pueden realizar utilizando animales con inmunidad materna.

a. Determinación de la inmunidad pasiva

Para comprobar la eficacia de las vacunas, es importante reflejar las condiciones naturales de la infección (Comisión Europea, 2008). La infección por el SHV-1 origina pérdidas importantes de lechones en cerdas no inmunizadas. Por tanto, cuando se vacunan reproductoras, el principal objetivo es proteger a los lechones mediante la inmunidad pasiva a través del calostro que se ingiere después del nacimiento, junto con el objetivo secundario de evitar abortos.

Se han desarrollado modelos experimentales para medir esta inmunidad pasiva y la protección inducida en cerdas por la vacunación. Las cerdas se vacunan durante la gestación siguiendo el procedimiento de vacunación. Cuando, por ejemplo, los lechones tienen 6–10 días se les expone a una cepa virulenta de SHV-1 por vía intranasal. Es preferible usar una cepa cuya titulación se exprese en dosis letales al 50% (DL₅₀). Cada cerdo debe inocularse por la vía nasal con 1 ml que contenga 10² DL₅₀. La eficacia de la vacuna se determina comparando los signos clínicos, y lo que es más importante, la mortalidad, o eutanassia por medios compasivos, en los lechones de las cerdas no vacunadas respecto a la observada en los lechones de las vacunadas.

Los lechones de las cerdas vacunadas pueden gozar de un 80% de protección contra la mortalidad en comparación con los de las cerdas control. Para que los resultados sean significativos se recomienda utilizar ocho cerdas vacunadas y cuatro cerdas control (siempre que haya un número suficiente de lechones por cada cerda).

b. Determinación de la inmunidad activa

1. Protección clínica

Para medir la inmunidad activa inducida en los cerdos mediante la vacunación, se pueden seguir varios criterios. Por lo general, los cerdos se vacunan al principio del

período de crecimiento, es decir, cuando tienen de 9 a 12 semanas de edad. Las pruebas de laboratorio se realizan mediante estímulos de desafío en los cerdos al final del período de engorde, cuando pesan entre 80 y 90 kg.

En general, para estimar la protección clínica de los cerdos después de la vacunación y el estímulo de desafío se utilizan al menos tres criterios, tales como la temperatura rectal, la pérdida de peso y los signos clínicos (De Leeuw & Van Oirschot, 1985). Los títulos de los anticuerpos tienen poco valor en la predicción de la eficacia de las vacunas. La pérdida de peso comparativa entre grupos vacunados y grupos control suele ser el parámetro más repetitivo y fiable cuando las condiciones del estímulo de desafío están bien estandarizadas. La medida de la diferencia en ganancia o pérdida de peso entre los dos grupos de cerdos, y el intervalo de tiempo transcurrido desde el desafío (día 0 y día 7) tiene un valor predictivo muy alto de la eficacia de la vacuna (Stellmann *et al.*, 1989). Se pueden obtener resultados importantes cuando se comparan los rendimientos de peso de un grupo de al menos ocho cerdos vacunados con los de un grupo control de ocho cerdos no vacunados.

En la prueba de desafío, normalmente se prefiere usar una cepa virulenta de título elevado, pues esto hace posible obtener diferencias más marcadas entre los cerdos vacunados y los cerdos control. Según trabajos previos, puede ser suficiente una dosis de estímulo con al menos 10^6 DICT₅₀/ml de cepa virulenta de no más de tres pases en células primarias, pero se recomienda un título mayor ($10^{7.5}$ DICT₅₀/ml). Se debe utilizar la vía buco-nasal para el estímulo de los cerdos introduciendo la cepa virulenta en un volumen alto apropiado (> 4 ml).

En la actualidad, este método de evaluar la eficacia de las vacunas con SHV-1 está debidamente probado y ha permitido establecer un índice objetivo para determinar la eficacia de una vacuna. Tal índice, que compara la pérdida relativa de peso entre los cerdos vacunados y los cerdos control, puede utilizarse también para comprobar la potencia de los lotes antes de su distribución y para la prueba de eficacia de los lotes. Sin embargo, el índice umbral será diferente si las condiciones analíticas no son idénticas. Debe evaluarse adecuadamente la influencia de la inmunidad adquirida pasivamente mediante anticuerpos derivados de la madre.

2. Excreción de virus virulento

Además, es deseable que las vacunas eviten, o al menos limiten, la excreción de virus en los cerdos infectados (Vannier *et al.*, 1991). Cuando un programa de control de la enfermedad de Aujeszky se basa en la vacunación a gran escala, es esencial escoger las vacunas o el esquema de vacunación que mejor limite la multiplicación del virus virulento en los cerdos infectados. A este respecto se han realizado varias pruebas para comparar las vacunas.

Generalmente, los cerdos se vacunan y se estimulan posteriormente a diferentes edades. Lo mejor, aunque más laborioso en cuanto al factor tiempo, es infectar a los cerdos al final del período de mantenimiento. Para medir la excreción de virus, se toman diariamente de cada cerdo hisopos nasales (tomados a 10 cm de profundidad en la nariz) desde el día anterior al desafío hasta al menos doce días después. Los bastoncillos de algodón se pueden pesar antes del muestreo e inmediatamente después para calcular el peso exacto de la mucosidad recogida. Se añade luego el medio a cada tubo que contiene la muestra de frotis. El virus se titula a partir del medio después de la congelación y descongelación.

Se pueden utilizar diferentes índices para expresar la cantidad de virus virulentos excretados por los cerdos, teniendo en cuenta la duración y el nivel de la excreción de virus, y el número de cerdos que excretan virus virulentos.

3. Duración de la inmunidad

Se recomienda que cualquier afirmación relativa a la aparición y duración de la inmunidad esté respaldada por datos analíticos. La determinación de la duración de la inmunidad puede basarse en pruebas de desafío o, en la medida de lo posible, en pruebas inmunológicas y serológicas.

ii) **Ensayos de campo**

En términos generales, resulta muy difícil determinar la eficacia de una vacuna en poblaciones animales. Para conseguirlo, sería necesario vacunar a los animales en ausencia del patógeno contra el que protege la vacuna, esperar luego al momento de la infección y comparar los efectos de la infección en los animales vacunados (o en la descendencia de las cerdas vacunadas) con los efectos en los no vacunados de la misma edad, en el mismo edificio y del mismo lote que los animales vacunados (o los protegidos por inmunización pasiva). Como todas estas condiciones son difíciles de lograr en los ensayos de campo, estos son más adecuados para las pruebas de inocuidad que para las de eficacia, excepto en el caso del desarrollo de vacunas DIVA, que ofrecen la oportunidad de evaluar la eficacia de vacunas en condiciones de campo (Bouma, 2005).

2.3.3. Estabilidad

Deben realizarse pruebas para verificar el periodo de validez propuesto por el fabricante. Estas pruebas siempre deben consistir en estudios en tiempo real; deben llevarse a cabo en un número suficiente de lotes (al menos tres) producidos según el proceso de producción descrito y en productos almacenados en el recipiente final, y normalmente incluyen pruebas de estabilidad biológica y físico-química. El fabricante tiene que aportar los resultados de los análisis que respalden el periodo de validez propuesto en todas las condiciones de almacenaje propuestas. Normalmente, el periodo de validez propuesto es el periodo durante el cual el producto se considera estable menos 3 meses.

3. Vacunas desarrolladas mediante la ingeniería genética

3.1. Vacunas existentes y sus ventajas

La ingeniería genética, junto con un mejor conocimiento de las funciones y las características de las glucoproteínas del SHV-1, ha contribuido a desarrollar nuevas vacunas. Así, por ejemplo, Quint *et al.* (1987) eliminaron la secuencia que codifica la glucoproteína E de la cepa NIA3. Esto dio lugar a una vacuna marcadora eficiente contra la enfermedad de Aujeszky, que permitió la diferenciación entre animales vacunados e infectados (vacunas DIVA). La mayoría de las vacunas empleadas actualmente se obtienen a partir de virus con eliminación de gen y derivadas de ADN recombinante. La eliminación de genes que codifican la glucoproteína E es la más empleada, lo cual permite obtener una vacuna vírica viva atenuada pero que al mismo tiempo protege contra los signos clínicos y reduce considerablemente el nivel de excreción vírica por parte de los cerdos vacunados e infectados. Dada la capacidad de algunas glucoproteínas del SHV-1 de inducir fuertes respuestas inmunitarias, se comprobaron las eficiencias de vacunas de ADN, formadas por plásmidos que codifican estas glucoproteínas. De hecho, la vacunación con ADN tiene muchas ventajas: facilidad de fabricación y producción estandarizada de plásmidos, ausencia de manipulación de partículas infecciosas, inducción de respuestas inmunitarias humorales y celulares, evitación de la inmunidad materna. El primer estudio sobre la vacunación con ADN contra la enfermedad de Aujeszky se publicó en 1997 (Gerds *et al.*, 1997). Se ha observado que el empleo de una nueva generación de plásmidos amplificando el nivel de transcripción génica de las proteínas de interés (Dory *et al.*, 2005) constituye una estrategia eficiente. Estas vacunas todavía no se comercializan.

3.2. Requisitos especiales para las vacunas desarrolladas mediante ingeniería genética, si las hay

Los criterios empleados para evaluar la calidad, la inocuidad y la eficacia de las vacunas desarrolladas mediante ingeniería genética son los mismos que los definidos para las vacunas convencionales (véase el apartado C.2). Sin embargo, debe prestarse especial atención a la estabilidad de la construcción del ADN recombinante.

BIBLIOGRAFÍA

- BANKS M. (1985). Detection of antibodies to Aujeszky's disease virus in whole blood by ELISA-disc. *J. Virol. Methods*, **12**, 41–45.
- BOUMA A. (2005). Determination of the effectiveness of pseudorabies marker vaccines in experiments and field trials. *Biologicals*, **33**, 241–245.
- DE LEEUW P.W. & VAN OIRSCHOT J.T. (1985). Vaccines against Aujeszky's disease: evaluation of their efficacy under standardized laboratory conditions. *Vet. Q.*, **7**, 780–786.

- DORY D., TORCHÉ A.M., BÉVEN V., BLANCHARD P., LOIZEL C. & CARIOLET R. (2005). Effective protection of pigs against lethal Pseudorabies virus infection after a single injection of low-dose Sindbis-derived plasmids encoding PrV gB, gC and gD glycoproteins. *Vaccine*, **23**, 3483–3491.
- ELOIT M., FARGEAUD D., VANNIER P. & TOMA B. (1989). Development of an ELISA to differentiate between animals either vaccinated with or infected by Aujeszky's disease virus. *Vet. Rec.*, **124**, 91–94.
- EUROPEAN COMMISSION (2008). Commission Decision of 21 February 2008 on additional guarantees in intra-Community trade of pigs relating to Aujeszky's disease and criteria to provide information on this disease 2008/185/EC: *Official Journal of the European Communities L* **316**, 5–35.
- EUROPEAN PHARMACOPOEIA, SIXTH EDITION (2008). Monograph 0744: inactivated Aujeszky's disease vaccine for pigs. Monograph 0745: Aujeszky's disease live vaccine for pigs for parenteral administration. European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare (EDQM), Council of Europe, Strasbourg, France.
- GERDTS V., JÖNS A., MAKOSCHEY B., VISSER N. & METTENLEITER T (1997). Protection of pigs against Aujeszky's disease by DNA vaccination. *J. Gen. Virol.*, **78**, 2139–2146.
- HOFFMAN B., BEER M., REID S.M., MERTENS P., OURA, C.A., VAN RIJN P.A., SLOMKA M.J., BANKS J., BROWN I.H., ALEXANDER D.J. & KING D.P. (2009). A review of RT-PCR technologies used in veterinary virology and disease control: sensitive and specific diagnosis of five livestock diseases notifiable to the World Organisation for Animal Health. *Vet. Microbiol.*, **139**, 1–23.
- LE POTIER M.F., FOURNIER A., HOUDAYER C., HUTET E., AUVIGNE V., HERY D., SANAA M. & TOMA B. (1998). Use of muscle exudates for the detection of anti-gE antibodies to Aujeszky's disease virus. *Vet. Rec.*, **143**, 385–387.
- MA W., LAGER K.M., RICHT J.A., STOFFREGEN W.C., ZHOU F. & YOON K.J. (2008). Development of real-time polymerase chain reaction assays for rapid detection and differentiation of wild-type pseudorabies and gene-deleted vaccine viruses. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **20**, 440–447.
- MARCHIOLI C.C., YANCEY R.J., WARDLEY R.C., THOMSEN D.R. & POST L.E. (1987). A vaccine strain of pseudorabies virus with deletions in the thymidine kinase and glycoprotein genes. *Am. J. Vet. Res.*, **48**, 1577–1583.
- MENGELE W.L., LAGER K.M., VOLZ D.M. & BROCKMEIER S.L. (1992). Effect of various vaccination procedures on shedding, latency and reactivation of attenuated and virulent pseudorabies virus in swine. *Am. J. Vet. Res.*, **53**, 2164–2173.
- McFERRAN J.B. & DOW C. (1975). Studies on immunisation of pigs with the Bartha strain of Aujeszky's disease virus. *Res. Vet. Sci.*, **19**, 17–22.
- MOENNIG V., WOLDESENBERT P., FEY H.R., LIESS B., DOPOTKA H.D. & BEHRENS F. (1982). Comparative evaluation of ELISA and neutralization test for the diagnosis of Aujeszky's disease. *In: Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science 17. Aujeszky's Disease*, Wittmann G. & Hall S.A., eds. Martinus Nijhoff, The Hague, The Netherlands, 51.
- PEJSAK Z.K. & TRUSZCZYNSKI M. (2006). Aujeszky's disease (Pseudorabies). *In: Diseases of Swine*, Ninth Edition, Straw B.E., Zimmerman J.J., D'Allaire S. & Taylor D.J., eds, Blackwell Science, Oxford, UK, 419–433.
- PENSAERT M., LABARQUE G., FAVOREEL H. & NAUWYNCK H. (2004). Aujeszky's disease vaccination and differentiation of vaccinated from infected pigs. *Dev. Biol. (Basel)*, **119**, 243–254.
- POL F., DEBLANC C., OGER A., LE DIMNA M., SIMON G. & LE POTIER M.-F. (2013). Validation of a commercial real-time PCR kit for specific and sensitive detection of Pseudorabies. *J. Virol. Methods*, **187**, 421–423.
- QUINT W., GIELKENS A., VAN OIRSCHOT J., BERNS A. & CUYPERS H.T. (1987). Construction and characterization of deletion mutants of pseudorabies virus: a new generation of 'live' vaccines. *J. Gen. Virol.*, **68**, 523–534.
- SCHOENBAUM M.A., BERAN G.W. & MURPHY D.P. (1990). A study comparing the immunologic responses of swine to pseudorabies viral antigens based on the ELISA, serum virus neutralization, and latex agglutination tests. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **2**, 29–34.
- STELLMANN C., VANNIER P., CHAPPUIS G., BRUN A., DAUVERGNE M., FARGEAUD D., BUGAUD M. & COLSON X. (1989). The potency testing of pseudorabies vaccines in pigs. A proposal for a quantitative criterion and a minimum requirement. *J. Biol. Stand.*, **17**, 17–27.

TOMA B. & ELOIT M. (1986). Pseudorabies virus antibodies (Aujeszky's disease). *In: Methods of Enzymatic Analysis X, Antigens and Antibodies 1*, Bergmeyer V.C.H., ed. D-6940 Weinheim, Germany

TOMA B., ELOIT M. & TILMANT P. (1986). Sérodiagnostic de la maladie d'Aujeszky: utilisation de prélèvements de sang sur papier filtre. *Rec. Med. Vet.*, **162**, 1111–1117.

VAN OIRSCHOT J.T., RZIHA M.J., MOONEN, P.J.L.M., POL J.M. & VAN ZAANE D. (1986). Differentiation of serum antibodies from pigs vaccinated or infected with Aujeszky's disease virus by a competitive immunoassay. *J. Gen. Virol.*, **67**, 1179–1182.

VAN OIRSCHOT J.T., TERPSTRA C., MOORMANN R.J.M., BERNS A.J.M. & GIELKENS A.L.J. (1990). Safety of an Aujeszky's disease vaccine based on deletion mutant strain 783 which does not express thymidine kinase and glycoprotein I. *Vet. Rec.*, **127**, 443–446

VAN RIJN P.A., WELLENBERG G.J., HAKZE-VAN DER HONING R., JACOBS L., MOONEN P.L. & FEITSMA H. (2004). Detection of economically important viruses in boar semen by quantitative Real Time PCR technology. *J. Virol. Methods*, **120**, 151–160.

VANNIER P., CAPUA I., LE POTIER M.F., MACKAY D.K., MUYLKENS B., PARIDA S., PATON D.J. & THIRY E. (2007). Marker vaccines and the impact of their use on diagnosis and prophylactic measures. *Rev. Sci. Tech.*, **6**, 351–372.

VANNIER P., HUTET E., BOURGUEIL E. & CARIOLET R. (1991). Level of virulent virus excreted by infected pigs previously vaccinated with different glycoprotein deleted Aujeszky's disease vaccines. *Vet. Microbiol.*, **29**, 213–223.

VISSER N. & LUTTICKEN D. (1988). Experiences with a gl-TK-modified live pseudorabies virus vaccine: strain Begonia. *In: Vaccination and Control of Aujeszky's Disease*, Van Oirschot J.T., ed. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 37–44.

WERNIKE K., BEER M., FREULING C.M., KLUPP B., METTENLEITER T.C., MÜLLER T., HOFFMANN B. (2014). Molecular double-check strategy for the identification and characterization of Suid herpesvirus 1. *J. Virol. Methods.*, **209**, 110–115.

YOON H.-A., EO S.-K., ALEVAS A.G., CHA S.-Y., LEE J.-H., CHAE J.-S., JANG H.-K., CHO J.-G. & SONG H.-J. (2006). Investigation of pseudorabies virus latency in nervous tissues of seropositive pigs exposed to field strain. *J. Vet Med. Sci.*, **68**, 143–148.

*
* *

NB: Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para la enfermedad de Aujeszky
(puede consultarse la página web de la OIE:

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

Por favor, contacte con los Laboratorios de Referencia de la OIE para más información sobre pruebas de diagnóstico, reactivos y vacunas para la enfermedad de Aujeszky

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1991. ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2018.