UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

CARRERA DE ESPECIALIZACIÓN EN DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO VETERINARIO

TRABAJO FINAL INTEGRADOR

"Comparación de dos técnicas serológicas para el diagnóstico del Virus de la Enfermedad de Aujeszky en granjas porcinas en saneamiento con vacunación."

Alumna: Méd. Vet. Valentina Irene Cane

Directora: Dra. María Soledad Serena

Codirectora: Dra. Norma Beatriz Pereyra

Presentación del trabajo: 3 de marzo de 2022

ÍNDICE

1-RESUMEN 4

2-INTRODUCCIÓN 6

2-1 El virus causante de la EA 6

2-2 Uso de vacunas contra EA en Argentina 7

2-3 El diagnóstico serológico de la infección por el VEA 8

3-HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 9

3-1 Hipótesis principales: 9

3-2 Objetivo general: 10

3-3 Objetivos específicos: 10

4- MATERIALES Y MÉTODOS 10

4-1 Selección de las granjas porcinas: 10

4-2 Metodología para la aplicación de vacunas en las granjas 11

4-3 Características de la vacuna aplicada 12

4-4 Obtención de las muestras de suero 12

4-5 Detección de anticuerpos por la técnica de ELISA ADV/gE 12

4-5-1 Detección de anticuerpos utilizando el kit ELISA anti-gpI IDEXX 13

4-6- Detección de anticuerpos por la técnica de SN 14

4-6-1 Mantenimiento de las líneas celulares para SN 15

4-6-2 Cepa viral utilizada en la SN 15

4-6-3 Técnica de SN 15

5- RESULTADOS 17

5-1 Resultados generales 17

5-2 Resultados de la Granja A 18

5-2-1 Resultados de ELISA 18

5-2-2 Resultados de SN 18

5-3 Resultados de la Granja B 26

5-3-1 Resultados de ELISA 26

5-3-2 Resultados de SN 27

5-4 Análisis estadísticos: 31

6- DISCUSIÓN 33

6-1 Concordancia entre pruebas 33

6-2 Títulos neutralizantes producidos por la aplicación de vacuna 35

6-2-1 Granja A 35

6-2-1-1 Animales vacunados no infectados 35
6-2-1-2 Animales vacunados infectados 36
6-2-2 Granja B 37
6-2-2-1 Resultados previos a la vacunación: infectados y no infectados no vacunados 37
6-2-2-2 Resultados de la vacunación: animales vacunados infectados y no infectados 38
7- CONCLUSIONES FINALES 40
8- BIBLIOGRAFÍA 41
9- ANEXOS 43
9-1 ANEXO N° 1: Planilla de muestreo oficial. 43
9-2 ANEXO N° 2: Planilla de trabajo de ELISA. 45

1-RESUMEN

1-1 Resumen

La Enfermedad de Aujesky (EA), causada por el *Herpesvirus suino* 1 (Virus de la EA, VEA) genera un gran impacto negativo en la producción porcina. El hospedador natural es el cerdo, que puede manifestar la enfermedad con problemas reproductivos, respiratorios o nerviosos, pero también la infección puede ser inaparente. El VEA establece un estado de latencia, y ante situaciones de estrés el virus puede reactivarse y excretarse nuevamente al medio ambiente. La EA se encuentra ampliamente distribuida en Argentina, bajo un Plan Nacional de Control y Erradicación (Res. 474/2009) que contempla la utilización de una vacuna a virus inactivado con una deleción del gen que codifica para la glicoproteína E (gE); esta vacuna se combina con un enzimoinmunoensayo que detecta anticuerpos (Ac) contra gE (ELISA ADV/gE), lo que permite distinguir los cerdos infectados de los vacunados. La seroneutralización (SN) es la prueba de oro para el diagnóstico de la enfermedad y permite identificar los Ac neutralizantes contra el VEA, como así también determinar un valor cuantificado expresado en título de Ac. El objetivo de este trabajo fue comparar los resultados del diagnóstico serológico del VEA utilizando las técnicas ELISA ADV/gE y SN, y analizar los títulos de anticuerpos por SN en animales vacunados infectados y no infectados de diferentes categorías productivas. Se analizaron sueros provenientes de dos granjas comerciales (granja A y granja B) de la provincia de Buenos Aires, Argentina, de ciclo completo y manejo intensivo. Las granjas llevaban a cabo un plan de saneamiento con vacunación. Se estudiaron 281 sueros, obtenidos en sangrados sucesivos primero por ELISA y luego por SN. Los títulos obtenidos por SN se categorizaron en títulos altos (64 a 256), medios (8 a 32) y bajos (2 a 4). El resultado de la concordancia entre pruebas a través del índice Kappa resultó en un nivel moderado. En las categorías de cerdos que recibieron más dosis de vacunas (cerdas) se detectaron títulos mayores. Un porcentaje alto de animales ELISA negativos vacunados no generaron Ac detectables por SN, lo que se asoció a la utilización de una vacuna inactivada y al número de dosis recibidas. Los títulos seroneutralizantes en cerdos ELISA positivos vacunados fueron variables, encontrándose en un rango de 2 a 256 (altos en su mayoría), mientras que en cerdos ELISA negativos vacunados, se encontraron predominantemente en un rango de 8 a 32, y en casi un 50% de estos animales no se detectaron Ac seroneutralizantes. Este trabajo aporta datos de gran utilidad para el plan nacional de erradicación de la EA, siendo el primer estudio que se realiza en el país donde se evalúan títulos de Ac neutralizantes contra el virus en animales vacunados e infectados.

Palabras clave: Enfermedad de Aujeszky – ELISA – títulos seroneutralizantes – porcinos – vacuna

1-2 Abstract

Comparison of two serological techniques used for the diagnosis of Aujeszky's Disease Virus in pig farms implementing vaccination

Aujesky's disease (AD), is caused by Suid herpesvirus 1 (AD virus, ADV) and it has a great negative impact on pig production. The virus affect pigs as primary hosts and reservoirs, and cause reproductive failure, respiratory disease and nervous disorders. The ADV establishes latency, and in stressful situations the virus can reactivate and can be excreted back into the environment. AD is widely distributed in Argentina, under an official control and eradication plan (Res. 474/2009) that contemplates the use of an inactivated virus vaccine with a deletion of the gene that codes for glycoprotein E (gE). This vaccine is combined with an enzyme immunoassay that detects antibodies (Ab) against gE (ELISA ADV/gE), which allows to distinguish infected pigs from vaccinated ones. Seroneutralization (SN) is the gold standard for the diagnosis of the disease and allows identifying neutralizing Ab against ADV, as well as determining a quantified value expressed as Ab titer. The objective of this work was to compare the results of the serological test of ADV using the ELISA ADV/gE and SN techniques, and to analyze the antibody titers by SN in infected and uninfected vaccinated animals of different productive categories. Sera from two multi-site farrow-to-finish farms (farm A and farm B) located in the province of Buenos Aires, Argentina, were analyzed. The farms carried out a virus eradication plan that included vaccination. Two hundred eighty one sera obtained in successive samplings first by ELISA and then by SN were studied. The titles obtained by SN were classified as high (64 to 256), medium (8 to 32) and low (2 to 4). The result of the concordance between tests through the Kappa index resulted in a moderate level. Higher titers were detected in the categories of pigs (sows) that received more doses of vaccines. A high percentage of vaccinated ELISA negative animals did not generate detectable Ab by SN, which was associated with the use of an inactivated vaccine and the number of doses received. Seroneutralizing titers in vaccinated ELISA positive pigs were variable, ranging from 2 to 256 (mostly high), while in vaccinated ELISA negative pigs, they were predominantly in a range of 8 to 32, and in almost 50% of these animals seroneutralizing Ab were not detected. This work provides highly useful data for the national AD eradication plan, being the first study to be carried out in the country where neutralizing titers of Ab against the virus are evaluated in vaccinated and infected animals.

Key words: Aujeszky disease – ELISA – seroneutralizing titers - swine - vaccine

2-INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Aujeszky (EA) es una virosis causada por el *Suidherpesvirus* 1 o Virus de la Enfermedad de Aujeszky (VEA) que afecta al cerdo y causa un gran impacto negativo en los sistemas de producción porcina. La mayoría de las especies animales son posibles hospedadores terminales o "accidentales" en la cadena epidemiológica; siempre se consideró que el hombre no enfermaba, pero recientemente se describieron cuadros nerviosos en humanos asociados al VEA (Hong NY y col. 2019). Únicamente el cerdo y el jabalí son hospedadores naturales, capaces de mantener el ciclo de multiplicación y transmisión viral. En cerdos adultos, jabalíes y cerdos cimarrones de cualquier edad, la EA tiende a presentar una forma asintomática o con síntomas que pasan desapercibidos. Teniendo en cuenta estos casos asintomáticos, el diagnóstico indirecto mediante la detección de anticuerpos es el comúnmente utilizado.

2-1 El virus causante de la EA

La EA es una enfermedad contagiosa que provoca pérdidas económicas importantes en la producción porcina debido a la muerte de animales jóvenes, abortos en hembras y deficiencias respiratorias en cerdos adultos. El VEA, pertenece a la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alphaherpesvirinae*, género *Varicellovirus* (Lee JY y col. 1979; Davison AJ y col. 2009). La partícula viral completa mide alrededor de 150-180 nm y está compuesta por cuatro componentes estructurales diferentes: el "core" central conteniendo el ADN lineal de doble cadena, el ADN viral está rodeado por la cápside de simetría icosaédrica compuesta por 162 capsómeros que miden 12 a 13 nm de largo por 9 a 10 nm de ancho con un conducto central de 4 nm. La cápside está rodeada por una proteína matriz denominada tegumento, que está asociado a una membrana lipídica conocida como envoltura en la que se insertan numerosas glicoproteínas (g) (Ben-Porat T y col. 1985; Pomeranz LE y col. 2005). El genoma viral de tipo ADN lineal de doble cadena posee un PM de 90 x 10^6 D, con 74% de G + C y aproximadamente 150.000 pb, suficientes para codificar entre 70 y 100 proteínas virales (Mettenleiter TC 1991).

El huésped natural del VEA es el cerdo, especie en la cual la infección se manifiesta de diferentes maneras, según se trate de individuos adultos o jóvenes. En los primeros puede causar abortos, problemas respiratorios e infecciones latentes, en los segundos es letal, en lechones de hasta 2 semanas de vida, con una mortalidad del 100% (Lee JY y col. 1979); la letalidad disminuye a medida que aumenta la edad, y es así que el porcino es la única especie

que puede sobrevivir a la infección, transformándose en el reservorio del virus en la naturaleza. Pueden infectarse también otras especies, tanto domésticas (bovino, ovinos, perros y gatos) como salvajes (rata, ratón, zorro, comadreja); y experimentalmente muchas otras especies incluidos los primates y las aves (Nara P 1985). Pero en estos casos, la enfermedad tiene siempre un curso agudo y termina con la muerte de los individuos afectados (Pianovi C 1982; Kluge J y col. 1993). Anteriormente la enfermedad no era considerada una zoonosis, pero trabajos recientes asociaron casos de encefalitis con infección causada por VEA en el humano (HongNa Y y col. 2019).

Los cerdos son los hospedadores primarios y los únicos animales en los que el virus permanece en estado de latencia. Esto puede ocasionar nuevos ciclos de infección por reactivación del virus en forma natural. Los animales en latencia dificultan el proceso de erradicación de la enfermedad porque representan potenciales focos de reinfección (Maes RK y col. 1997). Otro punto importante, es el contacto con cerdos salvajes infectados que pone en riesgo el estado sanitario de las piaras domésticas (Mettenleiter TC, 2000; Yoon HA y col. 2006; Steinrigl A y col. 2012). Todos los herpesvirus permanecen en un estado latente en el individuo infectado, en sitios específicos; el VEA lo hace especialmente en las neuronas de los ganglios nerviosos, y durante esa latencia no se producen manifestaciones clínicas, replicación viral o destrucción celular. Debido a distintos estímulos, el virus en estado latente, comienza a replicarse y la progenie se dirige vía axón hacia el sitio de infección inicial donde se replica y transmite a través de secreciones (Roizman B 1985; Wittmann G 1986). En los cerdos la reactivación viral puede producirse por muchas situaciones frecuentemente vinculadas al estrés como parto, transporte, hacinamiento, escasez de alimentos, sobreinfección por otros agentes infecciosos, cambio de hábitat, inmunodepresión, exposiciones a radiaciones UV y fiebre (Ben-Porat T 1985; Mettenleiter TC 1991; Crandell RA 1985).

2-2 Uso de vacunas contra EA en Argentina

La enfermedad fue diagnosticada por primera vez en Argentina en 1978 (Ambrogi A y col. 1981). A partir de ese año los brotes de la enfermedad fueron ocurriendo, primero en las zonas de mayor producción porcina del país, para luego extenderse a otras regiones de menor intensidad de producción. En el marco del Plan de Nacional de Control y Erradicación de la EA llevado a cabo por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), los planes de vigilancia consisten en la detección de anticuerpos contra el virus utilizando pruebas serológicas. La estrategia en la cual se basa el control es la disminución de las fuentes de

infección y la circulación viral a través de la eliminación de los animales serológicamente positivos de manera inmediata o programada, con o sin vacunación, a través de la vacunación sistemática o del despoblamiento-repoblamiento.

Para combatir esta enfermedad se han desarrollado vacunas inactivadas y vivas atenuadas. En Argentina se ha aprobado para su uso en el plan de saneamiento nacional una vacuna a virus inactivado (SENASA, 2009). Este tipo de vacunas, son seguras, estables y pueden aplicarse a cualquier categoría de animal sin mayores inconvenientes (Pereyra N y col., 2005). Las desventajas que conlleva su uso es la menor estimulación del sistema inmune, generando una respuesta fundamentalmente ligada a linfocitos T CD4+ con producción de anticuerpos solamente, y la necesidad de aplicar más dosis por la menor duración de la inmunidad generada (Sánchez-Vizcaíno JM, 2007). Este inmunógeno no logra prevenir la infección o el establecimiento de la latencia en los cerdos, pero sí disminuye la excreción viral y evita la manifestación de signos clínicos, favoreciendo la disminución de la circulación de viral en la granja. Esto hace que, aplicando las medidas de manejo necesarias junto con el uso de la vacuna, se logre disminuir la prevalencia a valores que posibilitan la eliminación total de la enfermedad (Pereyra N y col., 2005). Las vacunas a virus vivo modificado logran una mejor protección, ya que inducen una respuesta de tipo celular y humoral, pero tienen como principal problema la reversión a formas virulentas si la atenuación no es correcta, además de que la mantención del inmunógeno debe ser más cuidadosa (Traavik T, 2007). La vacuna generada contra el VEA tiene la particularidad de ser una vacuna de nueva generación basada en la deleción del gen que codifica para la proteína gE. La gE es importante para la neurovirulencia, la cual se ve drásticamente reducida al delecionarla (Kimman T y col., 1992; Jacobs L y col., 1993). El uso de este tipo de vacunas combinado con ensayos serológicos para detectar anticuerpos contra la glicoproteína ausente, permite distinguir cerdos vacunados de infectados.

2-3 El diagnóstico serológico de la infección por el VEA

La prueba serológica considerada “de oro” para el diagnóstico de la EA es la seroneutralización (SN). Esta prueba se caracteriza por tener elevada sensibilidad y especificidad, y permite conocer tanto la presencia como el título de los anticuerpos neutralizantes producidos contra el VEA por los animales muestreados, por lo que es posible estimar el nivel de inmunidad que genera el contacto viral en los cerdos (OIE, 2012, Enfermedad de Aujeszky, Manual Terrestre, Capítulo 2.1.2). A pesar de que la SN es un método reconocido ha sido reemplazado para el diagnóstico masivo de la EA por el enzimoinmunoensayo (ELISA). Lo anterior se debe a que

el ELISA, además de poseer valores de especificidad y sensibilidad elevados, es más sencilla y ofrece resultados de manera rápida, con la posibilidad de analizar un elevado número de muestras en poco tiempo. Agregado a esto, para poder llevar a cabo la SN, es necesario contar con un laboratorio de infraestructura más compleja, con insumos y equipos específicos de virología, y disponer de personal entrenado en diagnóstico virológico. Una de las cualidades que presenta en particular el ELISA que se utiliza en el diagnóstico de la EA, y la más valiosa en términos epidemiológicos, es la posibilidad de distinguir entre animales vacunados de los que han sufrido una infección natural. Este es específico para detectar anticuerpos anti-igE dirigidos a la glicoproteína estructural del VEA (gE) presente en todas las cepas de campo (ELISA diferencial/ADV-gE). Como se mencionó anteriormente, dicha glicoproteína está delecionada en la cepa vacunal. Esta prueba puede entonces ignorar los títulos de anticuerpos en animales vacunados con vacunas gE negativas y detectar animales infectados a campo (Echeverría MG y Nosetto EO 2000). La posibilidad de conocer este dato hace a la prueba de ELISA una herramienta de gran utilidad para la toma de decisiones durante la implementación de un plan de saneamiento en granja, y por ello juega un papel fundamental en la ejecución de planes de control y erradicación de la enfermedad a nivel país. La mayor sensibilidad que posee el ELISA favorece entonces la acción de segregar animales infectados por el virus, fuente de infección para animales sanos y responsables del mantenimiento de la enfermedad en un predio.

3-HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3-1 Hipótesis principales:

- Existe una concordancia moderada a baja entre las técnicas ELISA ADV/gE y SN aplicadas a sueros de cerdos provenientes de granjas de nuestro país infectadas con el VEA y en saneamiento con vacunación.
- Los títulos de anticuerpos que arroja la SN en sueros de cerdos provenientes de granjas infectadas que aplican vacuna inactivada contra el VEA, y que resultan negativos a la prueba de ELISA ADV/gE, son menores que los títulos detectados en sueros de cerdos positivos a ELISA ADV/gE.
- La utilización de la vacuna inactivada en granjas infectadas con el VEA genera títulos seroneutralizantes menores a 8 en cerdos no infectados con el virus de campo.

3-2 Objetivo general:

- Comparar los resultados del diagnóstico serológico del VEA utilizando las técnicas ELISA ADV/gE y SN en granjas porcinas de Argentina infectadas y en saneamiento con vacunación.

3-3 Objetivos específicos:

- Comparar los resultados de las técnicas de ELISA ADV/gE y SN en sueros provenientes de dos granjas infectadas y vacunadas de la provincia de Buenos Aires, Argentina.
- Medir los títulos seroneutralizantes en sueros positivos y negativos a ELISA ADV/gE provenientes de granjas infectadas en las que se aplican vacunas inactivadas contra el VEA.
- Analizar los resultados de la SN en sueros positivos y negativos a ELISA ADV/gE en diferentes categorías productivas de cerdos provenientes de granjas infectadas que aplican vacunas contra el VEA.

4- MATERIALES Y MÉTODOS

4-1 Selección de las granjas porcinas:

Se seleccionaron 2 granjas porcinas comerciales infectadas con el VEA (granja A y granja B), ubicadas en la Provincia de Buenos Aires, Argentina, las cuales estaban llevando a cabo un plan de saneamiento de acuerdo a lo establecido por el Programa de Control y Erradicación de la EA del SENASA (Resolución 474/2009). La elección se basó en la posibilidad de obtención de muestras de sangrados sucesivos además de información sobre el plan de vacunación aplicado.

Se analizaron los datos consignados en las planillas oficiales (Resol.474/2009, ANEXO 1) de cada muestreo, consistentes en la identificación y categoría de cada animal. De cada granja se obtuvo información sobre el número de reproductores, características del tipo de establecimiento, categorías de animales muestreados y estrategia de control de la enfermedad (plan de vacunación empleado y eliminación de positivos, entre otros). Se confeccionó una tabla donde se volcaron los datos obtenidos de cada establecimiento, los cuales se muestran a continuación.

Tabla N°1: Granja A y Granja B: características de las granjas analizadas y datos de interés referidos al plan de control y erradicación de la EA y cronología.

CARACTERÍSTICAS DE GRANJA	GRANJA A	GRANJA B
Número de cerdas en el plantel reproductor	550	200
Tipo de criadero según instalaciones y manejo	intensivo	intensivo
	ciclo completo	ciclo completo
CRONOLOGÍA		
Fecha del diagnóstico positivo Aujeszky	01/04/2013	10/11/2016
Signología previa al diagnóstico	no	si
Fecha de inicio de la vacunación	01/12/2016	22/09/2017
MANEJO DE LA ENFERMEDAD		
Tipo de reposición de reproductoras	interna	interna
Tipo de reposición de abuelas	externa	interna
Tipo de reposición de machos	externa	externa
Eliminación de seropositivos	si	no
Categorías muestreadas en los sangrados	recría	engorde
	engorde	cerdas
	cerdas	padrillos
	cachorras	

4-2 Metodología para la aplicación de vacunas en las granjas

Los establecimientos seleccionados adherían a protocolos de vacunación diferentes. Estos fueron confeccionados de acuerdo a las características del criadero, número de madres, prevalencia de la infección y recursos de la granja, en base a lo establecido en la Resolución N°474-09 de SENASA.

Granja A:

Plan de vacunación:

Las hembras de reposición interna se vacunaron con 2 dosis en su primovacunación pre-servicio a los 160 y 180 días de vida. Las cerdas se revacunaron con una dosis preparto a los 80 días gestacionales. En el caso de las cerdas abuelas, que se reponían externamente, al ingresar a la granja se les aplicaban 3 dosis separadas por 20 días. Los machos del plantel se vacunaron con dos dosis por primera vez y luego dos veces por año. Los cerdos de abasto se vacunaron con 2 dosis, a los 50 y a los 70 días de vida.

Granja B:

Plan de vacunación:

A las cachorras que ingresaron al plantel reproductor, todas de reposición interna, se les realizaron 2 dosis pre-servicio separadas por 20 días. No se realizaron revacunaciones pre-servicio en las multíparas. A los machos se les realizaba una dosis en el momento de ingreso a la granja. Dos veces al año se realizaron aplicaciones en sábana a todo el plantel reproductor. Los cerdos de abasto no se vacunaban.

4-3 Características de la vacuna aplicada

En ambos establecimientos se utilizó la vacuna AUSKIPRA-BK (Laboratorios HIPRA SA) compuesta por virus inactivado cepa Bartha k61 gE negativa. Este producto es el único inmunógeno disponible y aprobado por SENASA para combatir el VEA en Argentina actualmente.

La aplicación del inmunógeno se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante, es decir, colocando una dosis de 2 ml por vía intramuscular a cada cerdo, inyectando en el cuello por detrás de las orejas.

4-4 Obtención de las muestras de suero

Los sueros que se analizaron en este estudio fueron obtenidos del banco de sueros de uno de los laboratorios pertenecientes a la red de laboratorios acreditados por SENASA para el diagnóstico de la EA (LR0696). Los sueros fueron fraccionados y conservados en viales a temperatura de -20°C hasta su utilización. Se seleccionaron un total de 281 muestras.

Granja A: se obtuvieron 196 sueros obtenidos en 4 muestreos realizados en los años 2017, 2018 y 2019, con el plan de erradicación de la enfermedad ya vigente en la granja.

Granja B: se obtuvieron 85 sueros obtenidos en 3 muestreos practicados en los años 2016, 2017 y 2018. Las muestras de los primeros dos sangrados son de momentos previos a comenzar a aplicar la vacuna y el último sangrado corresponde a un momento posterior.

4-5 Detección de anticuerpos por la técnica de ELISA ADV/gE

Para la detección de anticuerpos por ELISA se utilizaron los siguientes kits comerciales autorizados por el SENASA: ELISA anti-gpI contra VEA de la marca IDEXX y CIVTEST SUIS ADVgE de HIPRA.

Las pruebas se realizaron bajo las instrucciones del fabricante en el laboratorio de la red de SENASA N° L0696.

Previo a la realización de las pruebas, se registró la posición de las muestras de suero a testear y la de los controles positivo (CP) y negativo (CN) en las planillas de trabajo (incluidas en los procedimientos del sistema de gestión del laboratorio); dichas planillas reproducen la posición de los 96 pocillos tapizados con el virus que proveen los kits de diagnóstico (ANEXO 2).

4-5-1 Detección de anticuerpos utilizando el kit ELISA anti-gpl IDEXX

Como ya se aclaró, el procedimiento fue realizado siguiendo las instrucciones del fabricante.
Los reactivos, almacenados en heladera, se llevaron a temperatura ambiente (18-26°C) antes de realizar el ensayo.
Se preparó la solución de lavado concentrada diluyéndola 1:10 con agua destilada o desionizada.
Las muestras y los controles se diluyeron 1:2 con la solución de dilución del kit utilizando una placa de 96 pocillos vacía, no provista por el kit. Se dispensaron luego 100 µl de las muestras a testear y los controles diluidos en la placa tapizada con el antígeno. Se cubrieron las placas con cubierta adhesiva y se incubaron 60 minutos a 18-26°C o toda la noche a 2-8°C (se utilizaron las dos formas de incubación estipuladas por el fabricante).
Posteriormente, tras la incubación se retiró el adhesivo, se descartó el líquido de cada placa por inversión y se procedió a hacer el lavado con 300 µl por pocillo, 4 veces (el kit indica 3 a 5), con la solución de lavado preparada previamente y para lo cual se utilizó un lavador automático Biotek modelo ELx50. Finalizado el lavado se eliminó el líquido excedente golpeando la placa sobre material absorbente en forma invertida.
Se añadieron 100 µl de la solución de conjugado consistente en anticuerpos monoclonales anti – VEA gE/HRPO (peroxidasa) a todos los pocillos, se colocó el adhesivo sobre las placas y se incubó por 20 minutos a 18-26°C.
Se realizó el lavado de la misma manera que se describió previamente.
Se dispensaron 100 µl de solución de sustrato en cada pocillo (solución de tetrametilbencida-TMB-), y se incubó en oscuridad durante 15 minutos a 18-26°C.
Finalmente, se agregaron 50 µl de la solución de frenado a cada pocillo y se realizó la lectura en un lector Biotek modelo ELx800 utilizando filtro de 650nm.
La prueba fue considerada válida cuando la diferencia entre la absorbancia del control negativo y positivo era mayor o igual a 0,300.
Para la interpretación de los resultados de cada muestra se aplicó la fórmula:

Porcentaje de inhibición (% IN) = 100 x (promedio del CN – muestra/promedio CN)

Se consideraron NEGATIVAS a las muestras con un % IN < 30%, SOSPECHOSAS con un % IN 30% ≤ % IN < 40% y POSITIVAS con un % IN ≥ 40%.
Los resultados obtenidos fueron transferidos a las planillas oficiales provistas por el SENASA.

4-5-2 Detección de anticuerpos utilizando el kit CIVTEST SUIS ADVgE HIPRA

El procedimiento se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante. La preparación de los reactivos, de la solución de lavado y la dilución de las muestras y los controles se realizó de la misma forma que con el kit ELISA anti-gpI IDEXX.

Se dispensaron 100 µl de las muestras y los controles diluidos en la placa tapizada con el antígeno. Se cubrieron las placas con cubierta adhesiva y se incubaron 60 minutos a 36-38°C (protocolo corto) o entre 15-24 horas a 2-8°C (protocolo largo); los dos tipos de incubación fueron utilizados en el análisis de las muestras.

Cumplido el tiempo de incubación, se retiró el adhesivo, se descartó el líquido de cada placa por inversión y se realizaron 3 lavados con 300 µl por pocillo con la solución de lavado preparada anteriormente utilizando un lavador automático Biotek modelo ELx800. Finalizado el lavado se eliminó el líquido excedente golpeando la placa sobre material absorbente en forma invertida.

Se añadieron 100 µl de la solución de conjugado consistente en anticuerpos monoclonales anti – VEA gE/HRPO (peroxidasa) a todos los pocillos, se colocó el adhesivo sobre las placas y se incubó por 30 minutos a 36-38°C.

Se realizó el lavado de la misma manera que se describió previamente.

Se dispensaron 100 µl de solución de sustrato en cada pocillo (solución de tetrametilbencidina -TMB-, y se incubó en oscuridad durante 15 minutos a 18-26°C.

Finalmente, se agregaron 100µl de la solución de frenado a cada pocillo y se realizó la lectura en un lector Biotek modelo EL-800 utilizando filtro de 450nm.

La prueba fue considerada válida si la diferencia entre la absorbancia del control negativo y positivo era mayor o igual a 0,600. Para obtener los valores de los controles positivos y negativos se promediaron los resultados de absorbancia.

Para la interpretación de los resultados de cada muestra se aplicó la fórmula:

Porcentaje de inhibición (% IN) = 100 x (promedio del CN – muestra/promedio CN)

Se consideraron NEGATIVAS a las muestras con un % IN < 40%, SOSPECHOSAS con un % IN 40% ≤ % IN < 45% y POSITIVAS con un % IN ≥ 45%.

Los resultados obtenidos fueron transferidos a las planillas oficiales provistas por el SENASA.

4-6- Detección de anticuerpos por la técnica de SN

Para la técnica de SN se utilizó el método convencional suero variable - virus constante de acuerdo a Martin y col. 1983. La misma se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Virología (LAVIR) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (FCV-UNLP).

4-6-1 Mantenimiento de las líneas celulares para SN

Para llevar a cabo la técnica se utilizaron las líneas celulares RK13, comprobadamente susceptibles al VEA.

Se realizaron subcultivos en forma semanal. Las células fueron mantenidas en frascos para cultivo celular T25 con medio esencial mínimo (MEM) y el agregado del 5% de suero fetal bovino (SFB).

Para obtener los subcultivos se descartó el medio de cultivo y se lavó 3 veces con 5 ml de solución de PBS estéril. Se agregó luego 1 ml de una solución de tripsina-EDTA y se incubó durante 10 minutos a 37°C. Posteriormente, se recuperó la suspensión de células desprendidas por la acción de la tripsina y realizando una dilución 1/5 con medio MEM. Finalmente se completó hasta un volumen de 5 ml con medio MEM con 5% de SFB.

4-6-2 Cepa viral utilizada en la SN

En este caso se utilizó la cepa Trenque Lauquen 1992 (TL92) aislada en el LAVIR y previamente titulada por el método estadístico de Reed y Müench. La suspensión viral con un título $DICT_{50\%}$ / x 50 µl = $10^{6.08}$ fue fraccionada y almacenada a -70°C hasta su utilización.

4-6-3 Técnica de SN

Preparación de las muestras:

Los sueros problema se inactivaron a 56°C durante 30 minutos en baño maría para destruir el complemento y sustancias con actividad antiviral o efecto neutralizante. Previo a su utilización se centrifugaron a 15.000 rpm durante 15 minutos.

Procedimiento de la técnica:

En una placa de 96 pocillos para cultivo celular se colocaron 25 µl de medio MEM en todos los pocillos menos en la primera fila. Se destinó una columna de la placa por suero problema para realizar las diluciones seriadas. Luego se colocaron 50 µl de cada muestra en el primer pocillo de cada columna (primera fila de la placa) y con una pipeta multicanal (utilizando siempre los mismos tips para cada muestra) se realizaron las diluciones seriadas en base logarítmica 2 hasta una dilución final de 1/256. Además, en cada placa se incluyeron en la última columna los controles de virus (CV) y de células (CCC). En la Figura N°1 se muestra cómo se dispusieron las muestras con sus respectivas diluciones y controles en cada placa.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	**M1 1/2**	**M2 1/2**	**M3 1/2**	**M4 1/2**	**M5 1/2**	**M6 1/2**	**M7 1/2**	**M8 1/2**	**M9 1/2**	**M10 1/2**	**M11 1/2**	**CCC**
B	**1/4**	**1/4**	**1/4**	**1/4**	**1/4**	**1/4**	**1/4**	**1/4**	**1/4**	**1/4**	**1/4**	**CCC**
C	**1/8**	**1/8**	**1/8**	**1/8**	**1/8**	**1/8**	**1/8**	**1/8**	**1/8**	**1/8**	**1/8**	**CCC**
D	**1/16**	**1/16**	**1/16**	**1/16**	**1/16**	**1/16**	**1/16**	**1/16**	**1/16**	**1/16**	**1/16**	**CCC**
E	**1/32**	**1/32**	**1/32**	**1/32**	**1/32**	**1/32**	**1/32**	**1/32**	**1/32**	**1/32**	**1/32**	**CV**
F	**1/64**	**1/64**	**1/64**	**1/64**	**1/64**	**1/64**	**1/64**	**1/64**	**1/64**	**1/64**	**1/64**	**CV**
G	**1/128**	**1/128**	**1/128**	**1/128**	**1/128**	**1/128**	**1/128**	**1/128**	**1/128**	**1/128**	**1/128**	**CV**
H	**1/256**	**1/256**	**1/256**	**1/256**	**1/256**	**1/256**	**1/256**	**1/256**	**1/256**	**1/256**	**1/256**	**CV**

Figura N°1: Esquema de diluciones de muestras (M) en las placas de SN: columnas 1 (M1) a 11 (M11) y filas A1 (1/2) a H12 (1/256); posición de los controles: control de cultivo celular (CCC) columna A12 a D12 y control de virus (CV) columna E12 a H12.

Posteriormente, se preparó la suspensión viral de la cepa TL92 a partir del stock, realizando una dilución 1/150 con medio MEM para lograr a razón de 100-300 partículas virales por pocillo. Se adicionaron 25 µl de la suspensión viral TL92 a cada pocillo, menos a los destinados al control de células. Luego, se incubó durante 60 minutos a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO_2.

Finalmente, se agregaron 100 µl de la suspensión de células con una concentración de 150.000 células/ml, en cada pocillo de la placa. Se incubó a 37°C con atmósfera con 5% de CO_2 durante 48hs.

Se procedió a la lectura definitiva de las placas mediante la observación de la presencia de efecto citopatogénico (ECP) utilizando un microscopio de luz invertida. Para la validación de la prueba se observaron los pocillos correspondientes a los controles. Se verificó que el control de células formara una monocapa completa y que el control de virus mostrara un ECP compatible con VEA.

El resultado de la SN se consideró como **negativo** en toda aquella muestra en la que el virus de la cepa utilizada logró producir ECP sobre la monocapa del cultivo celular; lo anterior indicó la ausencia de anticuerpos neutralizantes en el suero del animal muestreado.

El resultado se consideró **positivo** en todas las muestras en las que se visualizó que, en alguna de las diluciones realizadas, las células de la monocapa permanecieron intactas. En

las muestras positivas se consideró título final a la inversa de la última dilución en donde no se observaron ECP. Los títulos obtenidos se categorizaron de la siguiente manera: títulos altos: de 64 a 256; títulos medios: 8 a 32 y títulos bajos: 2 a 4.

5- RESULTADOS

5-1 Resultados generales

Como se mencionó anteriormente, se analizaron 281 muestras de sueros provenientes de 2 granjas porcinas infectadas con el VEA que implementaron un plan de saneamiento que incluía la utilización de vacuna inactivada y/o eliminación de positivos inmediata o diferida, de acuerdo a las posibilidades económicas de cada granja.
Las características de cada muestreo, orden de sangrados, cantidad y porcentaje de animales muestreados, como así también los resultados de las pruebas de ELISA y SN se encuentran resumidos en las tablas 2-1 y 2-2.

Granja A: se obtuvieron 196 sueros correspondientes a animales vacunados de 4 sangrados realizados en abril del 2017 (37 muestras), marzo de 2018 (66 muestras), octubre de 2018 (50 muestras) y mayo de 2019 (43 muestras).

Tabla N°2-1: Granja A: resultados de ELISA y SN; número y porcentaje de cerdos para cada resultado por sangrado.

FECHA	Nº DE	RESULTADOS ELISA			RESULTADOS SN	
	CERDOS	POSITIVO	SOSPECHOSO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
1° sangrado	37	20 (54,05%)	2 (5,41%)	15 (40,54%)	27 (73%)	10 (27%)
2° sangrado	66	51 (77,27%)	2 (3,03%)	13 (19,7%)	66 (100%)	0 (0%)
3° sangrado	50	4 (8%)	0 (0%)	46 (92%)	15 (30%)	35 (70%)
4° sangrado	43	0 (0%)	0 (0%)	43 (100%)	19 (47,5%)	21 (52,5%)
TOTAL	196	75	4	117	127	66

Granja B: se obtuvieron 85 sueros correspondientes a 3 sangrados realizados en noviembre de 2016 (7 muestras, prevacunación), junio de 2017 (19 muestras, prevacunación) y en abril 2018 (59 muestras, postvacunación).

Tabla N°2-2: Granja B: resultados de ELISA y SN; número y porcentaje de cerdos para cada resultado por sangrado.

FECHA	Nº DE	RESULTADOS ELISA			RESULTADOS SN	
	CERDOS	POSITIVO	SOSPECHOSO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
1° sangrado	7	7 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (71,43%)	2 (28,57%)
2° sangrado	19	17 (89,47%)	1 (5,26%)	1 (5,26%)	18 (94,74%)	1 (5,26%)
3° sangrado	59	51 (86,44%)	1 (1,69%)	7 (11,96%)	52 (88,14%)	7 (11,96%)
TOTAL	85	75	2	8	75	10

5-2 Resultados de la Granja A

5-2-1 Resultados de ELISA

En el muestreo del año 2017 el porcentaje de positivos fue del 54,05%, el de sospechosos 5,41% y el de negativos un 40,54%. Los resultados de principios y finales del año 2018 revelan un 77,27% de animales positivos, 3,03% sospechosos y 19,70% negativos en el mes de marzo, y para octubre solo un 8% de los cerdos analizados fue positivo. En el muestreo realizado a mediados de 2019 ya no se hallaron resultados positivos o sospechosos. Como se muestra en la tabla N°2-1, hubo un progresivo descenso del número de animales positivos a ELISA, lo que puede visualizarse en el gráfico N°1.

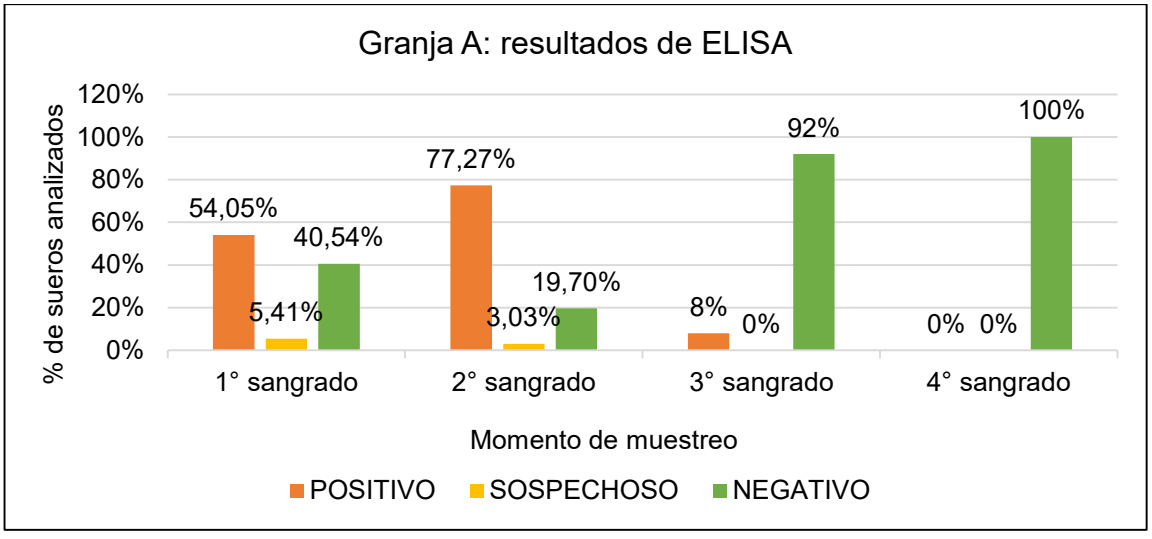


Gráfico N°1: Granja A: resultados serológicos obtenidos por ELISA en cuatro sangrados.

5-2-2 Resultados de SN

Como ya se explicó en la sección de materiales y métodos, mediante la observación y determinación de la presencia y/o ausencia de ECP característico del VEA (sincitios de forma y tamaño variables y redondeamiento celular) se calificó el resultado como positivo o negativo. En las muestras positivas, se registró el título obtenido.

Se desprende de la tabla N°2-1 que en el primer muestreo del año 2017 el 73% de los sueros fue positivo a SN. El segundo muestreo de marzo del año 2018 reveló que el 100% de los sueros era positivo, mientras que en el tercer muestreo del mes de octubre el 30% de los animales fue positivo a esta prueba. Finalmente, en el cuarto muestreo hecho en el 2019, el 47,5% de los sueros fue positivo para la SN; 3 de los sueros de este último sangrado no pudieron leerse por encontrarse contaminados por lo que no se contabilizaron. Se analizaron los títulos de SN globales teniendo en cuenta los resultados de ELISA. Todos los cerdos estudiados habían sido vacunados.

La tabla N°3-1 muestra los títulos de los cerdos ELISA positivos, es decir infectados con virus de campo. Un número elevado de individuos desarrolló anticuerpos (73%). Así, se observa que, dentro de la categoría cerdas, solo 1 animal presentó títulos bajos (1,82%), 13 presentaron títulos medios (23,64%) y 41 títulos altos (74,64%). Ninguna hembra mostró un resultado negativo a la prueba de SN. La única cachorra analizada presentó un título medio de 32. Cuatro de los nueve cerdos de engorde presentaron títulos altos (44,44%) y 3 títulos medios (33,33%); 2 animales de esta categoría fueron negativos a la SN. Los cerdos de recría, en un 90% (9 de 10), también fueron positivos a SN; 1 resultó negativo. El 55,55% de los cerdos de recría presentó títulos medios (5 de 9 animales), el 22,22% títulos altos y otro 22,22% títulos bajos (2 de 9 en cada caso); una muestra de esta categoría resultó negativa a la SN (10%).

Tabla N°3-1: Granja A, resultados globales: títulos neutralizantes en cerdos ELISA positivos de diferentes categorías productivas; se expresa el número de cerdos por categoría para cada título.

ELISA positivos	SN 2	SN 4	SN 8	SN 16	SN 32	SN 64	SN 128	SN 256	SN 0	TOTAL
RECRÍA	1	1	3	0	2	1	1	0	1	10
ENGORDE	0	0	1	1	1	2	1	1	2	9
CACHORRAS	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
CERDAS	1	0	2	4	7	6	1	34	0	55
TOTAL	2	1	6	5	11	9	3	35	3	75

La tabla N°3-2 muestra los títulos de los cerdos ELISA sospechosos, probablemente infectados con virus de campo. Las muestras fueron 4, el 50% representado por cerdas y el otro 50% por cerdos de engorde, todas fueron positivas a la SN presentando títulos medios los cerdos de engorde y una de las cerdas, la cerda restante presentó un título alto (256). A pesar de esos títulos medios y altos, el ELISA resultó sospechoso.

Tabla N°3-2: Granja A, resultados globales: títulos neutralizantes en cerdos con resultado sospechoso a ELISA en las diferentes categorías productivas; se expresa el número de cerdos por categoría para cada título.

ELISA sospechosos	SN 2	SN 4	SN 8	SN 16	SN 32	SN 64	SN 128	SN 256	SN 0	TOTAL
RECRÍA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ENGORDE	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2
CACHORRAS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CERDAS	0	0	0	0	1	0	0	1	0	2
TOTAL	0	0	0	1	2	0	0	1	0	4

La tabla N°3-3 muestra los títulos de cerdos ELISA negativos, o sea no infectados con virus de campo. Con respecto a estos, 32 cerdas de un total de 41 fueron positivas a SN (78,05%). Dos de estas hembras presentaron títulos bajos de 4 (6,25%), 22 títulos medios (68,75%) y 8 títulos altos (25%). Se registraron 9 cerdas con resultados negativos a la SN, es decir el 21,95% de las cerdas ELISA negativas. Respecto a las cachorras, 3 de 8 (37,5%) fueron negativas a SN, 2 presentaron títulos medios (40%) y 3 altos (60%). Entre los cerdos de engorde 47 de 61 analizados (77,05%) tuvieron resultados negativos a SN; el 22,95%, es decir 14 cerdos fueron positivos: se detectaron títulos bajos en 7 animales (50%), medios en 5 animales (37,71%) y altos en 2 (14,28%). Todos los cerdos de recría ELISA negativos también resultaron negativos a la SN.

Tabla N°3-3: Granja A, resultados globales: títulos neutralizantes en cerdos ELISA negativos de diferentes categorías productivas; se expresa el número de cerdos por categoría para cada título.

ELISA negativos	SN 2	SN 4	SN 8	SN 16	SN 32	SN 64	SN 128	SN 256	SN 0	TOTAL
RECRÍA	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4
ENGORDE	2	5	0	4	1	1	1	0	47	61
CACHORRAS	0	0	0	1	1	3	0	0	3	8
CERDAS	0	2	5	12	5	3	1	4	9	41
TOTAL	2	7	5	17	7	7	2	4	63	114

Para evaluar más detalladamente la evolución de los títulos en los sucesivos sangrados se desglosaron los resultados dividiéndolos según número de muestreo, categoría y resultado obtenido por ELISA. En las tablas N°4-1, 4-2 y 4-3 se muestran esos resultados para el primer sangrado de la Granja A.

En el primer muestreo, de acuerdo a los resultados de ELISA, el virus estaba circulando en la granja y ya se había comenzado con la vacunación. De los animales positivos a ELISA solo 3, el 15% (2 engorde y 1 de recría) fueron negativos a la SN. En los demás animales, 17 de 20 (85%), la SN fue positiva. La única cachorra analizada dio un título medio de 32. En 7 cerdos de engorde se registraron títulos seroneutralizantes de nivel medio en 3 cerdos y alto en 4, y de los 9 cerdos de recría, 2 presentaron títulos bajos, 5 medios y 2 altos.

Tabla N°4-1: Granja A, primer sangrado: número de cerdos ELISA positivos de diferentes categorías productivas; se expresa el número de cerdos por categoría para cada título.

ELISA positivos	SN 2	SN 4	SN 8	SN 16	SN 32	SN 64	SN 128	SN 256	SN 0	TOTAL
RECRÍA	1	1	3	0	2	1	1	0	1	10
ENGORDE	0	0	1	1	1	2	1	1	2	9
CACHORRAS	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
CERDAS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	1	1	4	1	4	3	2	1	3	20

Los cerdos con resultado de ELISA sospechoso fueron 2 pertenecientes a la categoría engorde, y en ambos se obtuvieron títulos medios de SN.

Tabla N°4-2: Granja A, primer sangrado: número de cerdos ELISA sospechosos de diferentes categorías productivas; se expresa el número de cerdos por categoría para cada título.

ELISA sospechosos	SN 2	SN 4	SN 8	SN 16	SN 32	SN 64	SN 128	SN 256	SN 0	TOTAL
RECRÍA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ENGORDE	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2
CACHORRAS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CERDAS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2

Los animales ELISA negativos del primer sangrado fueron 15. Siete fueron cachorras, 3 con resultado negativo a SN, 2 con títulos medios y otros 2 con títulos altos. Los 4 cerdos de recría ELISA negativos también fueron negativos a SN (26,66%). Los 4 animales de categoría engorde fueron SN positivos, con títulos bajos (1 de 4), medios (1 de 4) y altos (2 de 4). De manera que 7 de los 15 (50%) cerdos vacunados ELISA negativos no presentaron títulos a SN.

Tabla N°4-3: Granja A, primer sangrado: número de cerdos ELISA negativos de diferentes categorías productivas; se expresa el número de cerdos por categoría para cada título.

ELISA negativos	SN 2	SN 4	SN 8	SN 16	SN 32	SN 64	SN 128	SN 256	SN 0	TOTAL
RECRÍA	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4
ENGORDE	0	1	0	0	1	1	1	0	0	4
CACHORRAS	0	0	0	1	1	2	0	0	3	7
CERDAS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	0	1	0	1	2	3	1	0	7	15

Los resultados del segundo sangrado se muestran en las tablas N°5-1, 5-2 y 5-3. Este se realizó casi un año después, tiempo durante el cual se siguió vacunando y solo se sangraron cerdas. No se tienen resultados en cerdos de terminación, lo que confirmaría la circulación viral. El 100% de las cerdas fueron positivas a la SN. Los títulos que se obtuvieron en las hembras infectadas (ELISA positivas) fueron en su mayoría altos (37 de 51 cerdas, 72,55%), siendo el de título de 256 el más frecuente (fue el título del 81,08% de esas cerdas), las restantes (14 de 51 fueron) presentaron títulos medios (13 de 14) y bajos (1 de 14).

Tabla N°5-1: Granja A, segundo sangrado: número de cerdos ELISA positivos de diferentes categorías productivas; se expresa el número de cerdos por categoría para cada título.

ELISA positivos	SN 2	SN 4	SN 8	SN 16	SN 32	SN 64	SN 128	SN 256	SN 0	TOTAL
RECRÍA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ENGORDE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CACHORRAS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CERDAS	1	0	2	4	7	6	1	30	0	51
TOTAL	1	0	2	4	7	6	1	30	0	51

En este segundo muestreo 2 cerdas fueron sospechosas a ELISA y presentaron títulos a la SN medios (50%) y altos (50%).

Tabla N°5-2: Granja A, segundo sangrado: número de cerdos ELISA sospechosos de diferentes categorías productivas; se expresa el número de cerdos por categoría para cada título.

ELISA sospechosos	SN 2	SN 4	SN 8	SN 16	SN 32	SN 64	SN 128	SN 256	SN 0	TOTAL
RECRÍA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ENGORDE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CACHORRAS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CERDAS	0	0	0	0	1	0	0	1	0	2
TOTAL	0	0	0	0	1	0	0	1	0	2

Finalmente, 13 cerdas fueron negativas a ELISA, en 7 se detectaron títulos medios (53,85%) y en las otras 6, altos (46,15%).

Tabla N°5-3: Granja A, segundo sangrado: número de cerdos ELISA negativos de diferentes categorías productivas; se expresa el número de cerdos por categoría para cada título.

ELISA negativos	SN 2	SN 4	SN 8	SN 16	SN 32	SN 64	SN 128	SN 256	SN 0	TOTAL
RECRÍA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ENGORDE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CACHORRAS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CERDAS	0	0	0	3	4	3	1	2	0	13
TOTAL	0	0	0	3	4	3	1	2	0	13

El tercer sangrado se muestra en las tablas N°6-1 y 6-2. Este muestreo se realizó siete meses después del segundo, se siguió vacunando durante ese tiempo, se analizaron las categorías cerdas y cerdos de engorde: según la prueba de ELISA, no se detectaron positivos en estos últimos.

Las 4 cerdas positivas a ELISA (8%) fueron positivas a la SN con títulos de 256. Más de la mitad de los cerdos, 35 de 46 animales, no generaron anticuerpos vacunales (76%). Se detectaron títulos de SN (bajos, medios y altos) en 9 de las 16 cerdas ELISA negativas, las siete restantes resultaron negativas a SN. De los 30 cerdos de engorde ELISA negativos, solo 2 presentaron títulos medios (1/16) a la SN, en los sueros restantes (28) no se detectaron anticuerpos.

Tabla N°6-1: Granja A, tercer sangrado: número de cerdos ELISA positivos de diferentes categorías productivas; se expresa el número de cerdos por categoría para cada título.

ELISA positivos	SN 2	SN 4	SN 8	SN 16	SN 32	SN 64	SN 128	SN 256	SN 0	TOTAL
RECRÍA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ENGORDE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CACHORRAS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CERDAS	0	0	0	0	0	0	0	4	0	4
TOTAL	0	0	0	0	0	0	0	4	0	4

Tabla N°6-2: Granja A, tercer sangrado: número de cerdos ELISA negativos de diferentes categorías productivas; se expresa el número de cerdos por categoría para cada título.

ELISA negativos	SN 2	SN 4	SN 8	SN 16	SN 32	SN 64	SN 128	SN 256	SN 0	TOTAL
RECRÍA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ENGORDE	0	0	0	2	0	0	0	0	28	30
CACHORRAS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CERDAS	0	2	3	1	1	0	0	2	7	16
TOTAL	0	2	3	3	1	0	0	2	35	46

La tabla N°7-1 muestra los resultados del cuarto sangrado de la granja A. Este se realizó 7 meses después del tercero, se continuó con la vacunación en ese tiempo y ya no se detectaron animales positivos por ELISA. La SN fue positiva en 19 (47,5%) de los 40 cerdos evaluados. De estos, 9 fueron cachorras con títulos predominantes de 16 (88,88%), 8 cerdos de engorde con títulos bajos (6 de 8) y medios (2 de 8) y finalmente, 2 (10,53%) cerdas con títulos medios. La SN fue negativa en 21 animales (52,5%): 19 (90,48%) cerdos de engorde y 2 (10,52%) cerdas. En este caso, al incluirse animales de engorde, se vuelve a observar el 50% de los vacunados sin títulos seroneutralizantes.

Tabla N°7-1: Granja A, cuarto sangrado: número de cerdos ELISA negativos de diferentes categorías productivas; se expresa el número de cerdos por categoría para cada título.

ELISA negativos	SN 2	SN 4	SN 8	SN 16	SN 32	SN 64	SN 128	SN 256	SN 0	TOTAL
RECRÍA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ENGORDE	2	4	0	2	0	0	0	0	19	27
CACHORRAS	0	0	0	8	0	1	0	0	0	9
CERDAS	0	0	2	0	0	0	0	0	2	4
TOTAL	2	4	2	10	0	1	0	0	21	40

Continuando con el análisis de los anticuerpos generados, los niveles de títulos alcanzados con la vacunación en los cerdos no infectados de esta granja, se muestran en el gráfico N°2, donde se puede apreciar el predominio de los títulos medios. Según la categoría, en cerdas y cachorras se destacaron los títulos medios y altos, en los cerdos de engorde los bajos y en los animales de recría no se detectaron anticuerpos.

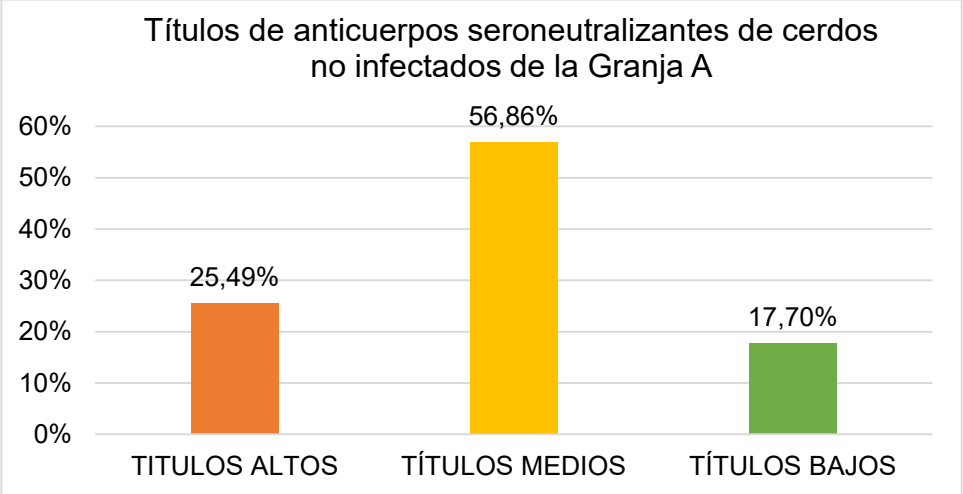


Gráfico N°2: Granja A: títulos de anticuerpos seroneutralizantes (vacunales) hallados en cerdos no infectados (ELISA negativos) en los 4 muestreos realizados.

Al evaluar los niveles de anticuerpos vacunales en los sucesivos sangrados (tablas N°4-3, 5-3, 6-2 y 7-1) se puede observar la tendencia a que los títulos de los cerdos no infectados fueron cada vez más bajos: los títulos altos conformaron el 50% en el primer muestreo, el 46,15% en el segundo, 18,18% en el tercero y 5,26% en el último; en el caso de los títulos medios los resultados de cada sangrado fueron 37,5%, 53,85%, 63,64% y 63,16% respectivamente; y los títulos bajos representaron el 12,5% en el primer sangrado, el 18,18% en el tercero y el 31,58% en el cuarto, no registrándose ningún cerdo con este tipo de títulos en el tercer sangrado. En el siguiente gráfico se expone la evolución de los títulos mencionada.

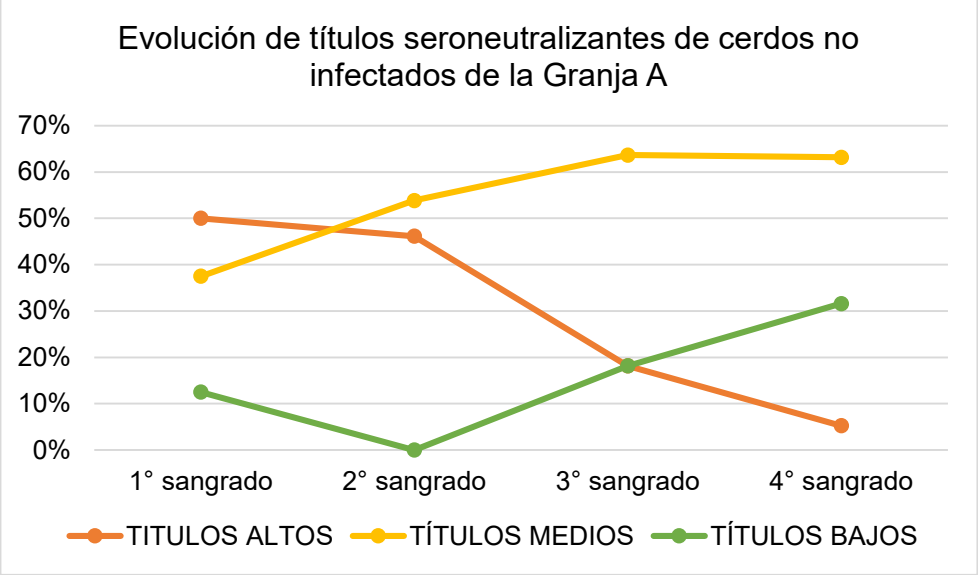


Gráfico N°3: Evolución de títulos seroneutralizantes o vacunales (altos, medios y bajos) en los sucesivos muestreos de la Granja A.

En comparación con los títulos de animales no infectados, los encontrados en animales infectados fueron más altos, como se ve en el gráfico Nº4. En este caso, en las cerdas y cachorras se destacaron los títulos altos, en los cerdos de engorde los altos y medios, y en los de recría predominaron los medios.

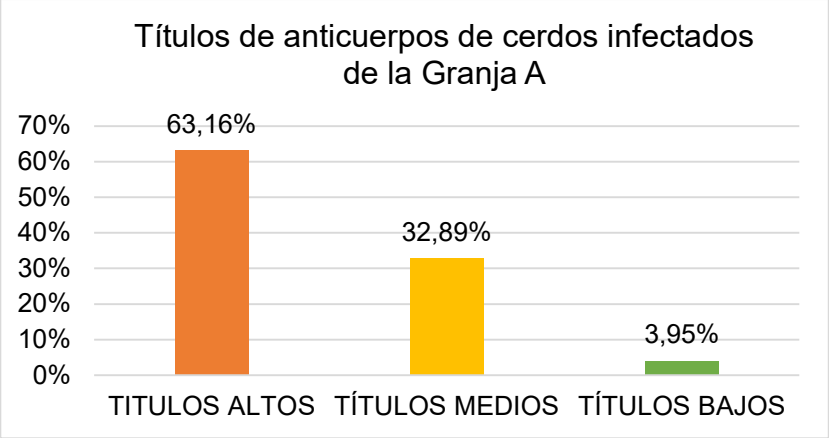


Gráfico N°4: Tipo de títulos de anticuerpos seroneutralizantes hallados en cerdos infectados y vacunados de la Granja A en los 4 muestreos realizados.

La circulación del virus en el engorde dejó de detectarse en el tercer muestreo, pero no pudo evaluarse correctamente en qué momento dejó de ocurrir, ya que en el segundo muestreo no se incluyeron cerdos de engorde en el sangrado. Este sería un dato interesante ya que estimaría cuánto tiempo pasó desde el inicio de la vacunación (en combinación con las otras medidas de control de la enfermedad) hasta que se logró disminuir la circulación viral en esta granja en particular.

5-3 Resultados de la Granja B

5-3-1 Resultados de ELISA

Los sueros analizados en la granja B en el año 2016 mostraron un 100% de positivos. En 2017 los sueros positivos fueron 89,48%, los sospechosos 5,26% y los negativos representaron el 5,26%. En el año 2018 los resultados fueron positivos en su mayoría (86,45%), un 1,69% fue considerado sospechoso y un 11,96% negativo. Los resultados obtenidos pueden visualizarse en el gráfico N°5.

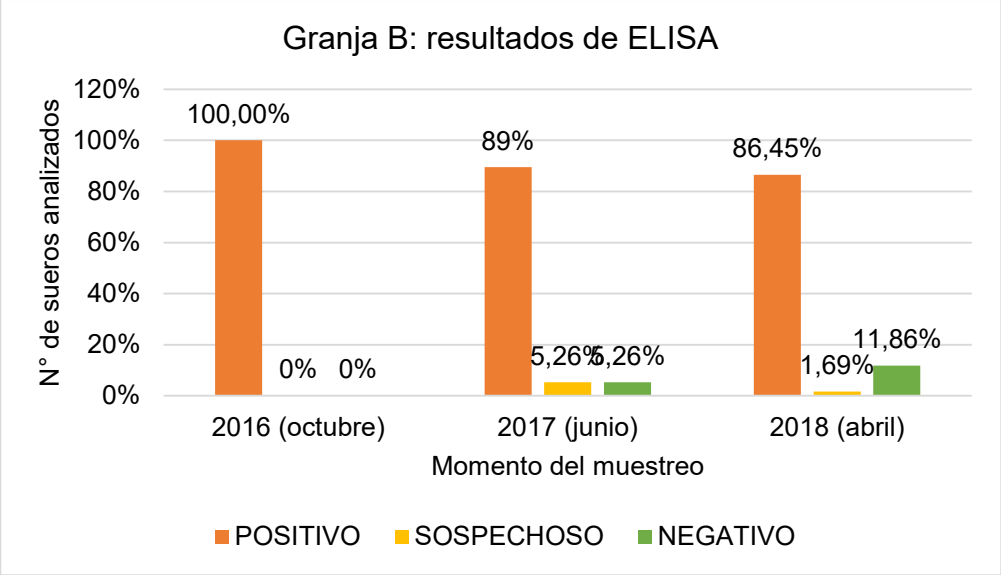


Gráfico N°5: Granja B: resultados serológicos obtenidos por ELISA.

5-3-2 Resultados de SN

Los resultados obtenidos en el muestreo de 2016 correspondiente a animales no vacunados arrojaron que el 71,43% de los sueros fueron positivos y el 28,57% negativos para la prueba de SN. Siete meses después, en el año 2017 aumentaron los positivos al 94,74%. Ninguno de los animales muestreados ese año se encontraba vacunado. En el último muestreo analizado, el del año 2018, solo el plantel reproductor había sido inmunizado y los sueros que resultaron positivos para este ensayo fueron el 88,14%. Dichos resultados se muestran en la tabla N°2-2.

A continuación, se muestran los títulos obtenidos en los 3 muestreos en las pruebas de SN para cada categoría productiva teniendo en cuenta el resultado de ELISA. En la tabla N°8 se exponen los resultados para el primer sangrado; durante éste se realizó el diagnóstico de la enfermedad.

En el primer sangrado solo se muestrearon cerdas a raíz de la aparición de problemas reproductivos; se observó que 5 animales ELISA positivos fueron también positivos a la SN con títulos altos (1 de 6), medios (3 de 6 hembras) y bajos (1 de 6). Dos cerdas ELISA positivas resultaron negativas a la SN.

Tabla N°8: Granja B, primer sangrado: número de cerdos ELISA positivos de diferentes categorías productivas; se expresa el número de cerdos por categoría para cada título.

ELISA positivos	SN 2	SN 4	SN 8	SN 16	SN 32	SN 64	SN 128	SN 256	SN 0	TOTAL
RECRÍA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ENGORDE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CACHORRAS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CERDAS	0	1	2	1	0	1	0	0	2	7
PADRILLOS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	0	1	2	1	0	1	0	0	2	7

En el segundo sangrado 17 de 19 cerdos fueron positivos a ELISA (89,47%): 14 cerdas, todas positivas a SN con títulos bajos y medios en 5 de 14 animales (29,41% en cada caso) y altos en 4 de 14 (23,53%); los 3 padrillos también fueron positivos a SN con títulos bajos de 4 (33,33%) y medios de 8 (66,64%); de los 2 animales restantes 1 cerda fue ELISA sospechosa, positiva a la SN con títulos medios (16) y otra fue negativa tanto a ELISA como a SN. En las tablas N°9-1, 9-2 y 9-3 se muestran los resultados: ya se había diagnosticado la enfermedad (siete meses antes) pero todavía no se vacunaba.

Tabla N°9-1: Granja B, segundo sangrado: número de cerdos ELISA positivos de diferentes categorías productivas; se expresa el número de cerdos por categoría para cada título.

ELISA positivos	SN 2	SN 4	SN 8	SN 16	SN 32	SN 64	SN 128	SN 256	SN 0	TOTAL
RECRÍA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ENGORDE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CACHORRAS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CERDAS	0	5	1	1	3	2	0	2	0	14
PADRILLOS	0	1	2	0	0	0	0	0	0	3
TOTAL	0	6	3	1	3	0	0	0	0	17

Tabla N°9-2: Granja B, segundo sangrado: número de cerdos ELISA sospechosos de diferentes categorías productivas; se expresa el número de cerdos por categoría para cada título.

ELISA sospechosos	SN 2	SN 4	SN 8	SN 16	SN 32	SN 64	SN 128	SN 256	SN 0	TOTAL
RECRÍA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ENGORDE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CACHORRAS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CERDAS	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
PADRILLOS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1

Tabla N°9-3: Granja B, segundo sangrado: número de cerdos ELISA negativos de diferentes categorías productivas; se expresa el número de cerdos por categoría para cada título.

ELISA negativos	SN 2	SN 4	SN 8	SN 16	SN 32	SN 64	SN 128	SN 256	SN 0	TOTAL
RECRÍA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ENGORDE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CACHORRAS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CERDAS	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
PADRILLOS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1

El tercer sangrado (muestreo de 2018) se realizó 10 meses después del segundo, incluyó 59 sueros pertenecientes a cerdas y animales de engorde. Ya se estaba llevando a cabo el plan de vacunación que sólo incluía la aplicación del inmunógeno en el plantel reproductor. Del total de 59, 51 (86,44%) tuvieron resultados positivos a ELISA. Treinta (58,82%) eran cerdas, las cuales fueron en su totalidad positivas a SN con títulos bajos (7 de 30), medios (17 de 30) y en menor proporción altos (6 de 30). Veintiún cerdos eran de la categoría engorde (41,18%) que presentaron títulos bajos y medios en igual proporción (9 de 21 animales en cada caso) y una minoría de 2 cerdos desarrolló títulos altos. Solo un animal esta categoría no produjo anticuerpos.

Los animales ELISA negativos fueron 7 cerdos (11,86%) de la categoría engorde. Cinco de ellos fueron negativos a SN y 2 positivos, uno de ellos con títulos bajos (2) y el otro con altos (256). Solo 1 cerdo fue sospechoso a la prueba de ELISA (1,70%), el cual resultó negativo a la SN.

En las tablas N°10-1, 10-2 y 10-3 se muestran los resultados para este último sangrado.

Tabla N°10-1: Granja B, tercer sangrado: número de cerdos ELISA positivos de diferentes categorías productivas; se expresa el número de cerdos por categoría para cada título.

ELISA positivos	SN 2	SN 4	SN 8	SN 16	SN 32	SN 64	SN 128	SN 256	SN 0	TOTAL
RECRÍA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ENGORDE	3	6	4	4	1	0	0	2	1	21
CACHORRAS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CERDAS	1	6	14	3	0	2	1	3	0	30
PADRILLOS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	4	12	18	7	1	2	1	5	1	51

Tabla N°10-2: Granja B, tercer sangrado: número de cerdos ELISA sospechosos de diferentes categorías productivas; se expresa el número de cerdos por categoría para cada título.

ELISA sospechosos	SN 2	SN 4	SN 8	SN 16	SN 32	SN 64	SN 128	SN 256	SN 0	TOTAL
RECRÍA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ENGORDE	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
CACHORRAS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CERDAS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PADRILLOS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1

Tabla N°10-3: Granja B, tercer sangrado: número de cerdos ELISA negativos de diferentes categorías productivas; se expresa el número de cerdos por categoría para cada título.

ELISA negativos	SN 2	SN 4	SN 8	SN 16	SN 32	SN 64	SN 128	SN 256	SN 0	TOTAL
RECRÍA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ENGORDE	1	0	0	0	0	0	0	1	5	7
CACHORRAS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CERDAS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PADRILLOS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	1	0	0	0	0	0	0	1	5	7

En esta granja se analizaron los anticuerpos generados antes y después de iniciar la vacunación. Previamente a la implementación de la misma, fueron 22 los animales reaccionantes a SN y todos ellos pertenecieron al plantel reproductor. Se encontraron como títulos predominantes los medios (45,45%), le siguieron los bajos (31,82%) y por último los altos (22,73%). A continuación, se grafican los títulos seroneutralizantes obtenidos, donde puede verse que también en esta granja los títulos de anticuerpos predominantes son los medios.

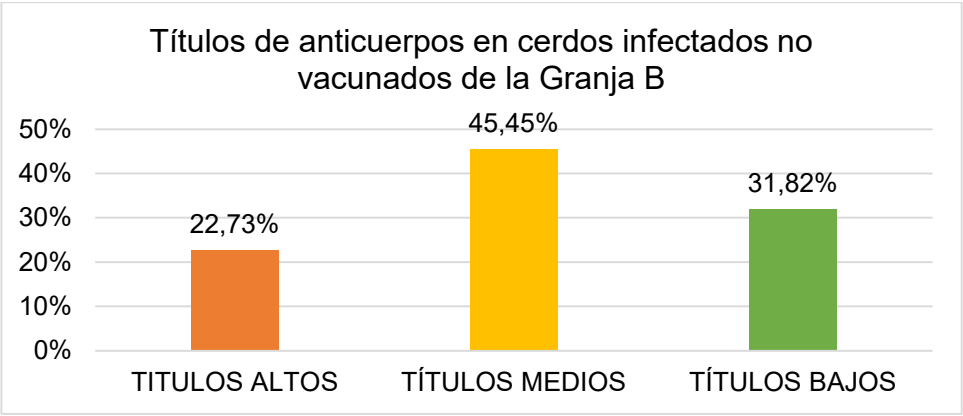


Gráfico N°6: Títulos de anticuerpos a SN (altos, medios y bajos) hallados en los cerdos infectados con virus de campo no vacunados de la Granja B.

De los 3 padrillos ELISA positivos muestreados, 2 presentaron un título medio de 8 y el restante un título bajo de 4. De las 19 cerdas infectadas el 42,11% desarrolló títulos medios, el 31,58%

bajos y el 26,31% altos. Solo 2 cerdas de los 24 animales infectados no desarrollaron anticuerpos seroneutralizantes.

Posteriormente a comenzar con la vacunación se evaluaron 59 muestras, el 88,14% resultó estar infectado con la cepa de campo. Dos de estos cerdos (2 de 52, 3,85%), no produjeron niveles de anticuerpos detectables por SN. El resto (50 cerdos, 96,15%) desarrolló títulos de inmunoglobulinas que en su mayoría fueron medios (26 de 50, 52%), en orden de importancia siguieron los bajos (16 de 50, 32%) y luego los altos (8 de 50, 16%), como puede apreciarse en el gráfico Nº7; los títulos predominantes siguen siendo los medios luego de la vacunación.

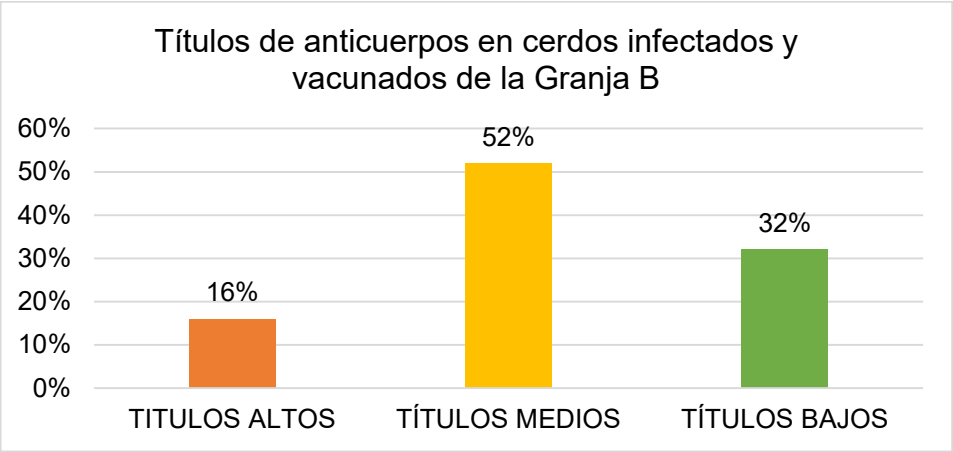


Gráfico N°7: Títulos de anticuerpos seroneutralizantes hallados en los cerdos infectados y vacunados de la Granja B.

De 7 cerdos de engorde ELISA negativos no vacunados evaluados, en 2 (28,57%) se detectaron títulos de anticuerpos seroneutralizantes, uno de nivel alto (256) y el otro bajo (4). Los demás animales ELISA negativos, (5 de 7, 71,43%) también tuvieron resultados negativos a la SN.

5-4 Análisis estadísticos:

Se calculó la concordancia entre las pruebas de ELISA y SN utilizando el programa WinEpi (www.winepi.net). Se utilizó el método estadístico Kappa (K) con un nivel de confianza de 95% para determinar el grado de concordancia entre ambas pruebas descartando el azar. Los sueros con resultado sospechoso a ELISA se trataron como positivos a la hora de realizar el análisis para poder incluirlos en la tabla.

Los resultados de Kappa pueden interpretarse como concordancia pobre (K < 2), baja (K= 0,21-0,4), moderada (K= 0,41-0,6), adecuada (K= 0,61-0,79), buena (K= 0,8-0,9) o excelente (K= 0,91-1) entre las pruebas testeadas.
Según este análisis, aplicado a la totalidad de las muestras, las pruebas diagnósticas SN y ELISA presentan un grado de concordancia moderado (K= 0,543).

Tabla N°11: Concordancia entre los resultados obtenidos por ELISA y SN de ambas granjas teniendo en cuenta animales vacunados y no vacunados.

	SN +	SN -	TOTAL
ELISA +	149	7	156
ELISA -	53	69	122
TOTAL	202	76	278

A continuación, se muestran las correlaciones entre las pruebas, pero haciendo la distinción de acuerdo a la granja y a si los animales se encontraban vacunados o no al momento del análisis.

Tabla N°12: Granja A: correlación entre los resultados obtenidos por ELISA y SN; estos datos incluyen la totalidad de las muestras ya que todos los cerdos se encontraban vacunados.

	SN +	SN -	TOTAL
ELISA +	76	3	79
ELISA -	51	63	114
TOTAL	127	66	193

Analizando las pruebas en animales vacunados de la granja A la concordancia también fue moderada (K= 0,471).

Tabla N°13: Granja B: correlación entre los resultados obtenidos por ELISA y SN correspondiente a animales no vacunados (dos primeros muestreos).

NO VACUNADOS	SN +	SN -	TOTAL
ELISA +	22	2	24
ELISA -	0	1	1
TOTAL	22	3	25

De manera similar, en el caso de cerdos no vacunados de la granja B la concordancia entre las pruebas fue moderada (K= 0,468).

Tabla N°14: Granja B: correlación entre los resultados obtenidos por ELISA y SN en animales vacunados.

VACUNADOS	SN +	SN -	TOTAL
ELISA +	50	2	52
ELISA -	2	5	7
TOTAL	52	7	59

Pero cuando se analiza la concordancia entre las pruebas en los cerdos vacunados de la granja B, está se clasifica como adecuada (K= 0,676).

Tabla N° 15: Granjas A y B: correlación entre los resultados obtenidos por ELISA y SN para cerdos vacunados.

VACUNADOS	SN +	SN -	TOTAL
ELISA +	126	5	131
ELISA -	53	68	121
TOTAL	179	73	252

La concordancia entre las pruebas teniendo en cuenta la totalidad de los cerdos vacunados de las dos granjas fue moderado (K= 0,532).

6- DISCUSIÓN

6-1 Concordancia entre pruebas

Cuando un animal se infecta con el VEA, el virus realiza una primera replicación en el sitio de entrada, es decir mucosas bucal y respiratoria, desde allí, las nucleocápsides son transportadas por vía nerviosa (pares craneales, especialmente trigémino e hipogloso), hacia las neuronas sensoriales del SNC donde, principalmente en las del ganglio trigémino, permanece el ADN viral en estado no infeccioso o “ADN episomal” lo que determina el estado de latencia (Crandell RA, 1985). En aquellos cerdos que sobreviven a la enfermedad, el virus permanece en estado latente, pero la latencia puede evolucionar hacia la reactivación por alguna situación de estrés como puede ser la gestación, la falta de alimento, el hacinamiento, etc.; durante la misma se produce progenie viral (nuevos virus) que recorre un camino inverso hacia las mucosas nasal y oral, convirtiéndose estos individuos en una fuente de diseminación e infección para el resto de los animales. Todos los cerdos infectados por el VEA generan anticuerpos específicos que permanecen, en general, de por vida, de manera que los cerdos infectados en forma latente muestran reacciones positivas a las pruebas serológicas. Así, los

programas de control de la enfermedad localizan los animales positivos mediante la detección de anticuerpos (Zimmerman JJ y col. 2019).

Las dos pruebas diagnósticas evaluadas, ELISA y SN, son las principales pruebas serológicas que permiten detectar los anticuerpos generados por el contacto con el VEA. La SN es considerada la prueba de oro para el diagnóstico de la EA, determina la presencia de anticuerpos neutralizantes y también es cuantitativa, ya que establece el título de inmunoglobulinas en el animal analizado. La SN posee excelentes sensibilidad y especificidad y por eso se la considera prueba patrón (OIE, 2012, Enfermedad de Aujeszky, Manual Terrestre, Capítulo 2.1.2.).

Desde el año 1990 gracias a la creación de vacunas que contienen agentes infecciosos con genes delecionados, fue posible distinguir anticuerpos producidos por la infección natural y los producidos por la vacunación (OIE, 2012, Enfermedad de Aujeszky, Manual Terrestre, Capítulo 2.1.2.). La técnica de ELISA que se creó en ese momento y sigue utilizándose actualmente para el diagnóstico de EA, reconoce anticuerpos anti-gE dirigidos contra la gE del VEA presente en todas las cepas de campo. Esta glicoproteína está delecionada en la cepa vacunal que se usa en Argentina, lo que garantiza la discriminación de cerdos infectados y vacunados dentro de un establecimiento (Echeverría MG y Nosetto EO 2000). El ELISA se considera más sensible que la SN en el período inicial de la infección. La mayor sensibilidad de ELISA en ese período con respecto a SN tiene que ver con la clase de inmunoglobulinas que se detectan: mientras que la SN detecta principalmente IgG, ELISA detecta IgM e IgG. Mientras tanto, la especificidad de estas pruebas es prácticamente del 100% (Schoenbaum M y col. 1990).

La técnica de ELISA es diferencial, por lo que, como se explicó, detecta solamente anticuerpos generados por la infección natural, la SN detecta los producidos tanto por la vacuna como por el virus de campo (OIE, 2012, Enfermedad de Aujeszky, Manual Terrestre, Capítulo 2.1.2.). El hecho de que estos ensayos no tengan el mismo poder de discriminación de las muestras, influencia la concordancia (Tarabla H 2000).

Por lo explicado, en este trabajo la concordancia hallada a través del índice Kappa resultó en un nivel moderado, lo que afirma la primera hipótesis planteada. Esta podría haber sido más baja aún si más cerdos vacunados hubieran producido más anticuerpos, pero como más de la mitad no lo hicieron entonces la concordancia resulta en los valores expuestos. Solo cuando se analizan por separado los animales vacunados de la granja B (tabla Nº14), la concordancia es adecuada. Ese resultado se debería a que hay más cerdos que son positivos y/o negativos a las dos pruebas cuando se compara con los cerdos no vacunados (tabla Nº13). El análisis de que no se hayan detectado anticuerpos generados por la vacuna por SN en muchos cerdos vacunados será explicado a continuación.

Como se mencionó anteriormente, los sueros con resultado sospechoso a ELISA se trataron como positivos para poder incluirlos en la tabla de doble entrada: se consideró que por tratarse

de granjas en saneamiento las decisiones de manejo que se toman sobre un animal positivo y un animal sospechoso son las mismas (Tarabla 2000; Duffy y Miquet 1996). Además, al analizar los resultados de ambas pruebas, podemos observar que los sueros sospechosos por ELISA fueron positivos por la técnica de SN; siendo esta secuencia la manera correcta de confirmar un resultado sospechoso.

6-2 Títulos neutralizantes producidos por la aplicación de vacuna

En nuestro país, la vacunación ha sido incorporada como alternativa de saneamiento desde el año 2016. Desde esa implementación, nunca se había evaluado el porcentaje de animales que responden a la vacuna, ni los títulos de anticuerpos seroneutralizantes de animales vacunados positivos y negativos a ELISA con diferentes esquemas de vacunación. Los resultados obtenidos en este trabajo aportan información acerca de la dinámica de la producción de anticuerpos luego de la vacunación y además refuerzan la importancia de complementar la vacunación con diferentes medidas de manejo para poder controlar y luego erradicar la enfermedad de un predio.
Cabe aclarar que los muestreos utilizados para este estudio no fueron dirigidos, es decir, la extracción de los sueros de cada categoría en cada momento en particular para cada granja no fue seleccionado con anterioridad. Para este trabajo se utilizaron muestras extraídas con el fin de ser analizadas para EA en el contexto de la realización de chequeos periódicos como indica el plan nacional en granjas que están en saneamiento. Por este motivo no se hizo el seguimiento individual de animales a través de los diferentes sangrados.

6-2-1 Granja A

6-2-1-1 Animales vacunados no infectados

Al analizar los resultados de ambas pruebas diagnósticas en la granja A, podemos observar que, de un total de 193 animales vacunados 114 fueron ELISA negativos, es decir que no tuvieron contacto con el virus de campo. De ellos, cerca de la mitad, el 44,7%, presentaron anticuerpos seroneutralizantes generados por la vacuna. Las cerdas presentaron títulos más altos que las otras categorías, lo cual era esperable que ya habían recibido más dosis vacunales. También fue lógico que se hallaran con más frecuencia títulos bajos en los animales de engorde no infectados que en cachorras y cerdas no infectadas, ya que esa categoría recibió menos dosis de vacuna.

Sin embargo, fue muy llamativo que casi un 55% de los cerdos vacunados no infectados no desarrollen títulos detectables por SN. Esto pudo deberse a un fallo en la administración del inmunógeno (errores técnicos a la hora de colocar la vacuna: sitio de aplicación incorrecto, material de inoculación inadecuado), falta de respuesta por parte de los individuos (inmunodepresión, inmunidad pasiva previa) o una corta duración de los anticuerpos circulantes (Tizard IR 2009). Debe considerarse también la posibilidad de que eso se deba a factores asociados a la técnica implementada: que los títulos producidos hayan estado por debajo de la posibilidad de detección de la SN (Duffell SJ y Harkness JW 1985) o que la inoculación haya ocurrido menos de 12 días antes de la extracción de la muestra, período a partir del cual la SN puede detectar anticuerpos (Zimmerman JJ y col. 2019). Según lo experimentado por Schoenbaum en 1990, en animales vacunados no infectados, la sensibilidad de la SN puede ser baja durante las tres primeras semanas.

A pesar de que no se detectaron títulos seroneutralizantes en la mitad de los animales de engorde, el efecto final deseado se cumplió en esta granja ya que logró negativizarse para la presencia de VEA. La efectividad de las vacunas a pesar de la ausencia de anticuerpos detectables, debe atribuirse también a la inmunidad celular, que si bien se estimula menos con vacunas inactivadas, también reacciona (Tizard IR 2009).

6-2-1-2 Animales vacunados infectados

El análisis de los títulos de los 79 animales infectados con virus de campo o ELISA positivos y sospechosos que fueron vacunados (tabla 3-1 y 3-2) arrojó que los títulos predominantes fueron los altos, encontrándose éstos en 48 de 76 cerdos (63,16%), luego siguieron los medios (25 de 76, 32,89%) y finalmente los bajos (3 de 76, 3,95%).

Es esperable que las cerdas infectadas tengan títulos altos, especialmente cuando siguen contactando con el virus de campo y también reciben dosis de vacuna. De esta forma el sistema inmune está siendo estimulado de manera permanente. Además, es esta la categoría animal que permanece más tiempo en el establecimiento, ya que aun cuando se sabe que son positivas, no siempre es posible eliminarlas inmediatamente, para no afectar la productividad de la granja (ej: cumplimiento de la cuota de monta).

La circulación del virus en el engorde dejó de detectarse en el tercer muestreo, pero no pudo evaluarse correctamente en qué momento dejó de ocurrir, ya que en el segundo muestreo no se incluyeron cerdos de engorde en el sangrado. Este sería un dato interesante ya que estimaría cuánto tiempo pasó desde el inicio de la vacunación (en combinación con las otras medidas de control de la enfermedad) hasta que se logró disminuir la circulación viral en esta granja en particular. Los cerdos infectados de esta categoría presentaron títulos medios y altos

en proporciones similares; los títulos fueron levemente superiores a los de cerdos de recría infectados, en los se hallaron principalmente títulos medios, además de bajos y altos en iguales proporciones. Se espera que a lo largo del tiempo los títulos disminuyan, excepto que el virus esté circulando y estimule continuamente el sistema inmune (Tizard IR 2009).
Hubo tres cerdos infectados por el virus de campo correspondientes a las categorías recría y engorde, que fueron negativos a la SN. Este hecho podría explicarse si se admite la posibilidad de que estos cerdos hayan sido sangrados en un momento en donde todavía no se habían generado anticuerpos seroneutralizantes.
En definitiva, es esperable que los animales ELISA positivos y vacunados presenten títulos seroneutralizantes mayores que los ELISA negativos vacunados.

6-2-2 Granja B

En el caso de la granja B, se pudieron analizar los resultados obtenidos antes de la implementación de la vacunación y luego de haberse comenzado a aplicar la misma. En este caso debe recordarse que el esquema de vacunación implementado no fue el recomendado, ya que sólo se vacunó el plantel reproductor.

6-2-2-1 Resultados previos a la vacunación: infectados y no infectados no vacunados

Los hallazgos previos al uso de la vacunación en su conjunto (primer y segundo muestreo, tabla N°13) en donde se analizó un total de 25 cerdos, muestran que el 96% de los animales se encontraba infectado con el virus de campo, y en su mayoría (91,67%) se detectaron anticuerpos con la técnica de SN. En los animales que permanecen por más tiempo en la granja (cerdas y padrillos) se detectaron principalmente títulos medios y bajos (en el 100% de los machos y 73,69% de las cerdas muestreados). Estos títulos son más bajos que los registrados en la granja A, aun cuando en esta última no había, a partir del tercer sangrado, circulación viral. Podría pensarse una explicación para justificar los menores títulos de los infectados de la granja B con respecto a los infectados de la granja A, y es que en el caso de la granja B, no se conoce el momento en que se infectó el establecimiento: si bien la infección se descubrió en el primer sangrado, se sospecha que la primoinfección fue anterior. Esto es porque el diagnóstico parte de la aparición de problemas reproductivos sin mortalidad en lechones. Los lechones constituyen la categoría más afectada cuando una granja se infecta por primera vez; luego cuando las cerdas infectadas traspasan anticuerpos por calostro a sus hijos, disminuye la mortalidad hasta desaparecer (Kristen SK y col. 1997). Podría pensarse que el nivel de anticuerpos no fue tan alto porque hacía mucho que el establecimiento se

encontraba infectado (Machengo A. y col. 1998), sin embargo, el virus estaba circulando (y estimulando el sistema inmune) ya que había animales de engorde positivos en el tercer sangrado. En los muestreos anteriores esto no se puede evidenciar porque no se obtuvieron sueros del engorde, pero por los niveles de positividad registrados en las cerdas más los resultados del tercer sangrado se deduce que la circulación ya se estaba dando.
Dos cerdas de los 24 animales infectados no desarrollaron anticuerpos seroneutralizantes, lo que podría deberse a un prolongado tiempo transcurrido desde la infección con el virus de campo hasta el muestreo, falla en la respuesta vacunal o en la aplicación del inmunógeno. Otras explicaciones para los resultados negativos a la SN ya fueron mencionadas.
Es esperable que los títulos obtenidos por SN sean más elevados en la etapa aguda de la enfermedad para luego disminuir y estabilizarse (Machengo A. y col. 1998; Tizard IR 2009).

6-2-2-2 Resultados de la vacunación: animales vacunados infectados y no infectados

Siete meses después de comenzarse a usar la vacuna se realizó el tercer muestreo (tabla N°14). El plan de vacunación no se ajustó a lo recomendado, ya que sólo se vacunó el plantel reproductor. No hubo diferencias significativas del nivel de títulos obtenidos por SN en este muestreo (predominaron los títulos medios y bajos en el 82,52% de los animales con SN positiva) con respecto al anterior, a pesar de que además de la circulación viral también se estaba vacunando.
En referencia a los títulos registrados pudo encontrarse una situación similar a la que ocurrió en la granja A en la que, a medida que disminuyó el número de animales infectados por el VEA, los títulos altos empezaron a disminuir en relación a títulos medios y bajos. Si bien en el caso de la granja B la disminución de la detección de cerdos ELISA positivos fue mínima (de 89% al 86,45%), puede verse una pequeña merma en el porcentaje de títulos altos registrados en el tercer muestreo (gráfico N°6 y 7). Esta observación podría corroborarse si se lograran analizar más sangrados en el tiempo para ver cómo evolucionan los títulos en la piara.
En cuanto a los cerdos no infectados con la cepa de campo, todos correspondientes a la categoría de engorde (no vacunados), solo en 2 (28,57%) se detectaron títulos de anticuerpos seroneutralizantes, con título alto (256) en un caso y bajo (4) en el otro. Muy probablemente estos anticuerpos sean de tipo maternal, ya que como se aclaró, la vacuna no se aplicó en esta categoría, y si bien se espera que los niveles de anticuerpos maternales desaparezcan a las 15 semanas, podrían persistir por más tiempo en algunos casos; además, se supone que las hembras infectadas transfieran un alto nivel de anticuerpos a sus lechones, por eso en esta granja los anticuerpos maternales podrían ser más duraderos (Zimmerman JJ y col. 2019). Los 5 animales restantes (71,43%) tuvieron resultados negativos a la SN.

A modo de conclusión resaltamos que en la granja A pudo observarse una marcada disminución de los cerdos ELISA positivos hasta llegar a la negativización del establecimiento. Fue interesante la dinámica de desarrollo de los anticuerpos vacunales a medida que se fue saneando la piara, ya que los títulos protectores tendieron a ser más bajos a medida que se avanzó con el plan y cada vez quedaron menos animales infectados. No se sabe si esta misma dinámica se replica en todas las granjas que se negativizan con vacunación, ya que no existen otros estudios de este tipo en el país.
Analizando los resultados de SN obtenidos, pudieron asociarse los títulos de cada categoría a la cantidad de dosis vacunales que recibieron durante su vida productiva. Las cerdas, a las que les fueron aplicadas varias dosis de inmunógeno, se caracterizaron por presentar títulos más altos. En orden decreciente le siguen las cachorras, con menos dosis de inmunógeno recibido (durante su crecimiento y preservicio) que muestran tanto títulos medios como altos. Por último, los cerdos de engorde, con dos dosis de vacuna recibidas, mostraron principalmente títulos bajos y en menor medida medios y altos. Un número relativamente alto de animales no desarrollaron anticuerpos pese a haber recibido aparentemente varias dosis de vacuna. Ya se enumeraron las posibles causas de esta situación, a las que podría agregarse diferentes manejos no reportados para este análisis como puede ser la eliminación de positivos e ingreso de animales nuevos los cuales hayan recibido un menor número de dosis de vacuna. Sin embargo, las evidencias en esta granja parecen indicar que un correcto esquema de vacunación en cuanto a cantidad de dosis y a categorías a inmunizar, sumado a medidas de manejo como eliminación de positivos, resultaron efectivos a largo plazo para controlar y finalmente erradicar la EA.

En el caso de la granja B, en los dos primeros muestreos se estudiaron los títulos inducidos exclusivamente por el contacto con la cepa de campo, en animales positivos a ambas pruebas que no habían sido vacunados. Los títulos que se hallaron fueron en su mayoría medios (45,45%), le siguieron los bajos (31,82%) y por último los altos (22,73%). Este no es el resultado que se esperaba encontrar en un establecimiento en el que el virus está circulando: la respuesta humoral esperada sería una en la que predominen los títulos altos (Schoenbaum M y col. 1990; Tizard IR 2009)
Cuando se analizaron los títulos de anticuerpos se observó que fueron bajos en comparación con los de los títulos obtenidos en animales infectados y vacunados de la granja A. Podría asociarse esta última situación a la superposición de anticuerpos infecciosos y vacunales (Schoenbaum M y col. 1990; Tizard IR 2009).

En esta granja hubo una tendencia muy leve a la negativización de los animales muestreados a medida que transcurrió el tiempo. El esquema de vacunación implementado no fue el aconsejado por las entidades sanitarias; la falta de vacunación de los lechones seguramente contribuyó a que continuara la circulación del VEA en los animales de abasto. En esta situación con numerosas cerdas infectadas, es inevitable que los lechones se infecten al no estar inmunizados.

Sería interesante seguir evaluando muestreos de este establecimiento para definir mejor la evolución en el tiempo de los títulos de anticuerpos de animales vacunados. Lamentablemente, la cantidad de cerdos analizados vacunados no infectados fue muy baja (solo 7 animales), y la mayoría de esos cerdos no generaron anticuerpos lo que impidió establecer títulos vacunales predominantes en este establecimiento.

En esta granja, en donde se detectaron numerosas cerdas infectadas, era seguramente inevitable que los lechones se infecten al no estar inmunizados. Para lograr resultados, conociendo el comportamiento de la enfermedad, el plan de vacunación debe ser el adecuado.

7- CONCLUSIONES FINALES

-La correlación entre las pruebas diagnósticas ELISA diferencial y SN, utilizadas en granjas infectadas con el VEA y en saneamiento con vacunación es moderada.

-Los títulos seroneutralizantes en cerdos provenientes de granjas infectadas que aplican vacuna inactivada contra el VEA, y que resultan negativos a la prueba de ELISA, son mayores a 8 y se encuentran predominantemente en un rango de 8 a 32.

-Los títulos seroneutralizantes en cerdos provenientes de granjas infectadas que aplican vacuna inactivada contra el VEA, y que resultan positivos a ELISA ADV/gE son muy variables y se encuentran en un rango de 2 a 256.

-Las cerdas vacunadas, positivas o negativas a ELISA son las que generan mayores niveles de anticuerpos seroneutralizantes.

-La mitad de los cerdos de engorde vacunados negativos a ELISA no desarrollan anticuerpos detectables por SN.

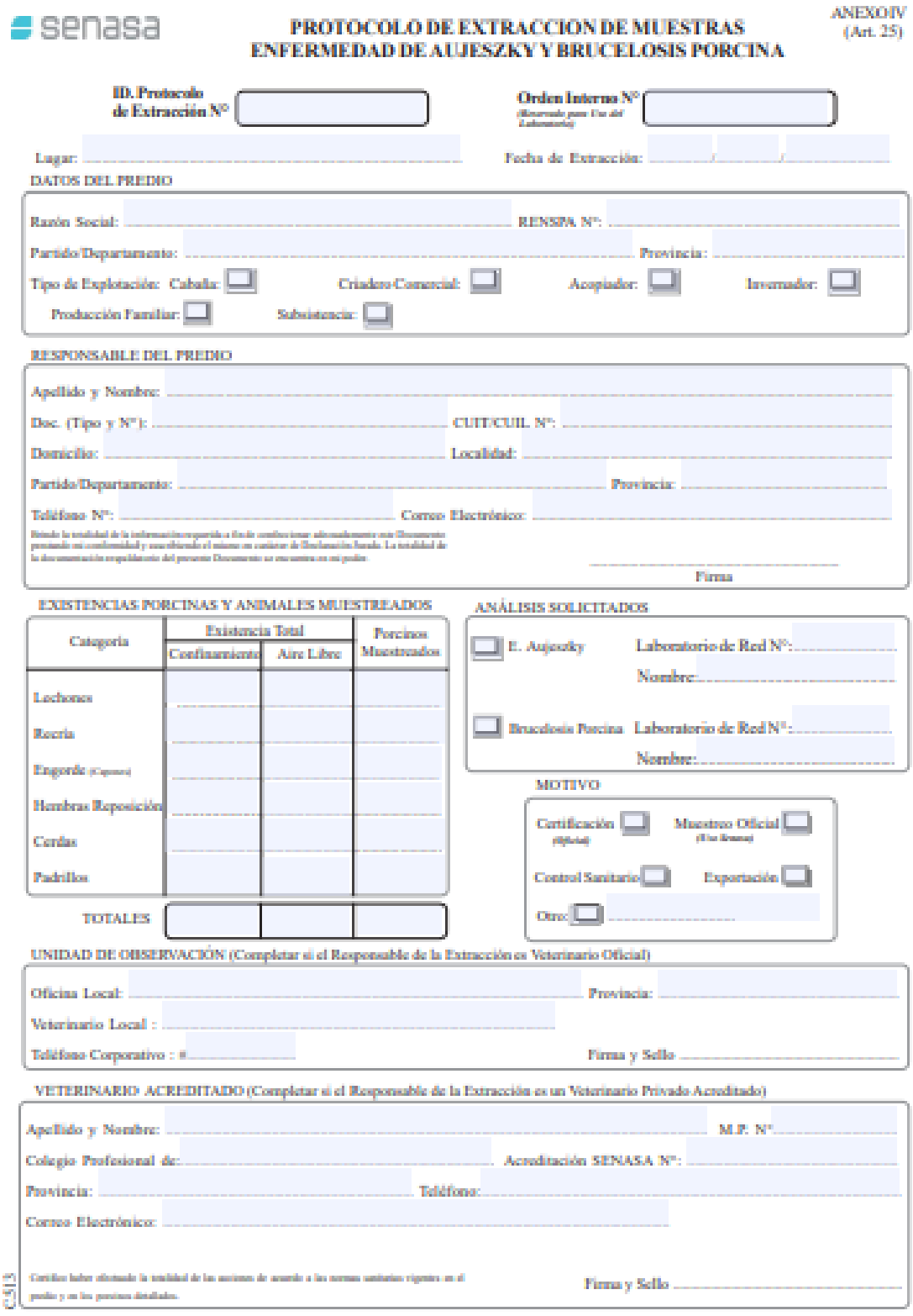
8- BIBLIOGRAFÍA

- Ambrogi A. y col. (1981). Primer diagnóstico de la Enfermedad de Aujeszky en cerdos en la República Argentina. Gaceta Veterinaria, 43:58-64.
- Arias M y col. (2002). Enfermedad de Aujeszky. Curso digital de enfermedades infecciosas porcinas: Sánchez Vizcaíno Editor y Coordinador. www.sanidadanimal.info.
- Ben-Porat T. y col. (1985). Molecular biology of Pseudorabies virus: Roizman B, editor. The Herpesviruses Plenum Press; New York; p. 105-73.
- Crandell R.A. (1985). Selected animal herpesviruses: new concepts and technologies. Adv Vet Sci.Comp Med. 29:281-327.
- Davison A. J. y col. (2009). The order Herpesvirales.Arch Virol, 154(1):171-7.
- Duffell, S.J. y Harkness, J. W. (1985). Bovine virus diarrhoea-mucosal disease infection in cattle. Vet.Rec., 117:240-245.
- Duffy S.J. y Miquet J.M. (1996). Consideraciones generales sobre vacunación y vacunas dentro del marco de erradicación del virus de la Enfermedad de Aujeszky. Memorias Seminario Taller Nacional Control y Erradicación de la Enfermedad de Aujeszky, Argentina.
- Echeverría M.G. y Nosetto E.O. (2000). Actualización en Enfermedad de Aujeszky. Analecta Veterinaria 20,2:22-30.
- Hong N.Y. y col. (2019). A case of viral human encephalitis caused by Pseudorabies Virus infection in China. DOI: 10.3389/fneur.2019.00534.
- Jacobs L. y col. (1993). Deleting two amino acids in glycoprotein gI of pseudorabies virus decreases virulence and neurotropism for pigs, but does not affect immunogenicity. J.Gen. Virol; 74:2201-6.
- Kimman T. y col. (1992). Role of different genes in the virulence and pathogenesis of Aujeszky's disease virus. Vet. Microbiol. 33:45-52.
- Kristen S.K. y col. (1997). Effect of the concentration of maternal antibodies on the neural invasion of Aujeszky's disease virus in neonatal pigs. Vet. Microbiol. 55(1-4):29-36. ISSN 0378-1135. https://doi.org/10.1016/S0378-1135(96)01303-X.
- Lee J.Y. y col. (1979). A review of pseudorabies (Aujeszky's disease) in pigs. Can Vet J. 20(3):65-9.
- Machengo A. y col. (1998). Evidencia serológica del Virus de la Enfermedad de Aujeszjy (Pseudorrabia) en porcinos. Rec Inv Pec IVITA (Perú). 9(1):38-43.
- Maes R.K. y col. (1997). Recent developments in latency and recombination of Aujeszky's disease (pseudorabies) virus. Vet. Microbiol. 55:13-27.
- Mettenleiter T.C. (1991). Molecular biology of pseudorabies (Aujeszky's disease) virus. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 14(2):151-63.
- Mettenletiter T.C. (2000). Aujeszky's disease (pseudorabies) virus: the virus and molecular pathogenesis-State of the art, June 1999. Veterinary Research 31:99-115.
- Nara P. (1985). Porcine Herpesvirus 1. Comparative Pathobiology of Viral diseases. Olsen RD *y* col. editors. Vol 1, CRC Press; Florida, USA; p. 89-113.
- Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (2012). Enfermedad de Aujeszky. "Manual Terrestre". Capítulo 2.1.2. www.oie.int.
- Pereyra N. y col. (2005). Enfermedad de Aujeszky. Enfermedades de los porcinos. 1ª ed. Rosario, Argentina. UNR Editora. p. 45-73.
- Pianovi C. (1982). Enfermedad de Aujeszky: epidemiología y control. Memorias Jornadas de Actualización Porcina, Enfermedades Infecciosas, UNRC Editora; Río Cuarto, Argentina; p. 312-323.
- Pomeranz L.E. y col. (2005). Molecular biology of pseudorabies virus: impact on neurovirology and veterinary medicine. Microbiol Mol Biol Rev. 69(3):462-500.
- Roizman B. y col. (1985). Herpesviruses and their replication. Virology Fields, B N et al (eds), New York. Raven Press.

- Sanchez-Vizcaino J.M. (2007). Vacunas y sueroterapia. Manual de Inmunología Veterinaria. Ed. 1. Prentice-Hall. 25:514-535.
- Servicio Nacional de Sanidad Animal y Calidad Agroalimentaria (2009). Resolución 474/2009. http://www.senasa.gob.ar/normativas/resolucion-474-2009-senasa-servicio-nacional-de-sanidad-y-calidad-agroalimentaria.
- Schoenbaum M. y col. (1990), A study comparing the immunologic rresponses of swine to pseudorabies viral antigens base don the ELISA, serum virus neutrlization an lartex agglutination tests. J. Vet Diagn Invest 2:29-34.
- Steinrigl A. y col. (2012). Detection and molecular characterization of Suid herpesvirus type 1 in Austrian wild boar and hunting dogs. Veterinary Microbiology 157: 276-284.
- Tarabla H. 2000. Epidemiología diagnóstica. Centro de Publicaciones, UNL, Santa Fe, Argentina.
- Tizard I. R. (2009). El empleo de vacunas. Introducción a la inmunología veterinaria (8a. ed.). Elsevier, p. 274-277.
- Traavik T. (2007). GE vaccines: benefits and risks. Conference. Troms Biosafety Course.
- Yoon HA y col. (2006). Investigation of pseudorabies virus latency in nervous tissues of seropositive pigs exposed to field strain. Journal Veterinary Medical Sciences 68(2): 143-148.
- Wittmann G. (1986). La enfermedad de Aujeszky. Rev Sci Tech Off Int Epiz, 5:995-1009.
- Zimmerman J. J. y col (2019). Aujesky´s desease. Diseases of Swine. 11° edición. 35: 548-575 ISBN:9781119350903.

9- ANEXOS

9-1 ANEXO N° 1: Planilla de muestreo oficial.



senasa

ANEXO IV
(Art. 25)

PROTOCOLO DE EXTRACCION DE MUESTRAS
ENFERMEDAD DE AUJESZKY Y BRUCELOSIS PORCINA

ID. Protocolo de Extracción N°

Orden Interno N°
(Reservado para Uso del Laboratorio)

Lugar: _____ Fecha de Extracción: ____/____/____

DATOS DEL PREDIO

Razón Social: _____ RENSPA N°: _____

Partido/Departamento: _____ Provincia: _____

Tipo de Explotación: Cabaña: ☐ Criadero Comercial: ☐ Acopiador: ☐ Invernador: ☐

Producción Familiar: ☐ Subsistencia: ☐

RESPONSABLE DEL PREDIO

Apellido y Nombre: _____

Doc. (Tipo y N°): _____ CUIT/CUIL N°: _____

Domicilio: _____ Localidad: _____

Partido/Departamento: _____ Provincia: _____

Teléfono N°: _____ Correo Electrónico: _____

Firma

EXISTENCIAS PORCINAS Y ANIMALES MUESTREADOS

Categoría	Existencia Total		Porcinos Muestreados
	Confinamiento	Aire Libre	
Lechones			
Recría			
Engorde (Capones)			
Hembras Reposición			
Cerdas			
Padrillos			
TOTALES			

ANÁLISIS SOLICITADOS

☐ E. Aujeszky Laboratorio de Red N°: _____ Nombre: _____

☐ Brucelosis Porcina Laboratorio de Red N°: _____ Nombre: _____

MOTIVO

Certificación (Oficial) ☐ Muestreo Oficial (Uso Interno) ☐

Control Sanitario ☐ Exportación ☐

Otro: ☐ _____

UNIDAD DE OBSERVACIÓN (Completar si el Responsable de la Extracción es Veterinario Oficial)

Oficina Local: _____ Provincia: _____

Veterinario Local : _____

Teléfono Corporativo : #_____ Firma y Sello _____

VETERINARIO ACREDITADO (Completar si el Responsable de la Extracción es un Veterinario Privado Acreditado)

Apellido y Nombre: _____ M.P. N°: _____

Colegio Profesional de: _____ Acreditación SENASA N°: _____

Provincia: _____ Teléfono: _____

Correo Electrónico: _____

Certifico haber efectuado la totalidad de las acciones de acuerdo a las normas sanitarias vigentes en el predio y en los animales detallados.

Firma y Sello _____

C.S.I.S.

DETALLE DE MUESTRAS REMITIDAS

Tubo Nº	Caravana Nº	Edad del Porcino	Categoría	Tubo Nº	Caravana Nº	Edad del Porcino	Categoría

OBSERVACIONES

COMPROBANTE RECEPCIÓN LABORATORIO

......./........./.........

Fecha

Recibido Laboratorio

9-2 ANEXO N° 2: Planilla de trabajo de ELISA.

Fecha:
Placa N°:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												