



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**“DESEMPEÑO PROFESIONAL EN EL
CENTRO NACIONAL DE SERVICIOS
DE DIAGNÓSTICO EN SALUD
ANIMAL (CENASA)”**

**TRABAJO PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :
OCTAVIO CRUZ CHÁVEZ**

ASESOR: Dr. HUMBERTO ALEJANDRO MARTÍNEZ RODRÍGUEZ.

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

1.-Introducción General.....	3
2.-El CENASA y su estructura.....	10
3.-Generalidades.....	15
4.-Descripción del desempeño profesional.....	38
5.-Procedimientos técnicos para la constatación de vacunas vivas contra la Enfermedad de Aujeszky	39
6.-Análisis y discusión.....	65
7.-Recomendaciones.....	66
8.-Conclusiones.....	67
9.-Bibliografía.....	68
FIGURAS.	
Fig1. Ubicación CENASA.....	8
DIAGRAMAS.	
Diagrama 1. Organigrama CENASA	11
Diagrama 2. Organigrama vacunas y reactivos.....	12
Diagrama 3. Emisión del resultado final.....	64
ESQUEMAS.	
Esquema 1. Vacunas de ingeniería genética.....	34
Esquema 2, 3 y 4 Virus de la Enfermedad de Aujeszky (VEA)	36
CUADROS.	
Cuadro1. Especies susceptibles al virus de la Enfermedad de Aujeszky	17
Cuadro 2. Características de las vacunas de ingeniería genética.....	35
Cuadro 3. Nomenclatura y características de las glicoproteínas (gP) presentes en la envoltura del VEA	37
Cuadro 4. Principales inmunógenos vacunales empleados en las vacunas comerciales gE-	37

1. INTRODUCCIÓN GENERAL.

Mi experiencia profesional en el Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal (CENASA) se inicia a partir del año de 1982, durante el cual he desarrollado diversas actividades entre las cuales destacan:

TÉCNICO MEDIO (Noviembre 1982 a Diciembre 1984).

Cuidado, manejo y alimentación de diversas especies animales utilizadas en la Constatación de Biológicos veterinarios.

Recolección en rastros y granjas de órganos y sueros para la realización de cultivos celulares.

Desinfección de material, equipo e instalaciones al concluir las pruebas biológicas.

TÉCNICO PROFESIONAL (Enero 1985 a Febrero 1989).

Responsable interino del Departamento de Constatación.

Responsable de la constatación de vacunas contra la Fiebre Porcina Clásica (FPC).

Replicación, titulación y conservación de cepas de desafío de FPC, Enfermedad de Aujeszky (EA), virus de estomatitis vesicular (VSV).

Elaboración y titulación de conjugado de FPC.

Control de calidad de sueros hiperinmunes contra veneno de arácnidos, botrophs, crotalus.

Mantenimiento y conservación de diversas líneas celulares.

Realización de pruebas fisicoquímicas a diferentes productos biológicos.

Responsable de las áreas de cuarentena y unidades de aislamiento.

COORDINADOR DE TÉCNICOS PROFESIONALES (Marzo 1989 a Diciembre 1999).

Análisis de protocolos de los productos para registro y monitoreo, elaboración de lista de necesidades, calendarización y distribución de actividades para la constatación de productos biológicos.

Responsable de la constatación general de vacunas y bacterinas para su uso en bovinos, porcinos, caninos, felinos y equinos

Constatación de productos biológicos elaborados a partir de ingeniería genética.

Implementación y estandarización de técnicas de laboratorio.

Capacitación y asesoramiento técnico a personal profesional y de servicio social.

TÉCNICO SUPERIOR (Enero 2000 a la fecha).

Responsable de la constatación general de vacunas contra la enfermedad de Aujeszky, de vacunas para caninos, felinos y equinos.

Replicación, titulación y conservación de cepas virales de referencia utilizadas en la constatación de biológicos.

Elaboración, titulación y conservación de sueros hiperinmunes y antisueros utilizados en la constatación de biológicos veterinarios (FPC, EA, y Paramixovirus porcino).

ESTANCIAS.

“Cross Protection Immunology and Genetic Engineering”. Immvac, Incorporated-Bass Lane, Columbia, Missouri, USA 19 th of October until the 30 th 1996.

OTRAS ACTIVIDADES.

Inspector en el operativo para el control y la erradicación de la enfermedad de Newcastle velogénico viscerotrópico en la región de la comarca lagunera (Abril 2000).

Inspector en el diagnóstico de la FPC en el laboratorio de Tlaquepaque, Jalisco (Octubre 2000).

Vocal en el subcomité no. 45 del CONAPROZ. Requisitos mínimos que deben cumplir las vacunas y reactivos empleados en el diagnóstico, control y prevención de la enfermedad de Aujeszky.

Participación en la elaboración de la NOM-048-ZOO-1996. Requisitos mínimos para las vacunas contra la enfermedad de Aujeszky.

Supervisión de procesos de producción y pruebas de control de calidad de biológicos para uso en bovinos y porcinos. (Laboratorio Novartis Larchwood Iowa, USA. Abril 2003).

CURSOS.

Técnicas Zoonositarias no. 39 (CENASA 1986).

Curso de Actualización de Fiebre Porcina Clásica para el personal de los laboratorios de diagnóstico (CENASA 1991).

Curso Principios de Operación, Manejo y Conservación de Equipo de Laboratorio (CENASA 1992).

Curso de Capacitación en Técnicas de Inmunoensayo (ELISA) aplicadas al Diagnóstico de Enfermedades de los Animales (CENASA 1993).

Curso Internacional sobre Producción de Biológicos (Instituto Nacional de Higiene 1995).

Primer seminario-“Taller Nacional sobre el Diagnóstico y Control de la Leptospirosis”(UAM Xochimilco 1997).

Curso taller para la Unificación de Criterios para el Diagnóstico de la Enfermedad de Newcastle (CENASA 2000).

Diagnóstico de Fiebre Porcina Clásica y Enfermedad de Aujeszky (SENASICA-CENASA 2004).

Curso de Capacitación y Actualización en el Diagnóstico de Fiebre Porcina Clásica y Enfermedad de Aujeszky (SENASICA-CENASA 2005).

Curso “Buenas Prácticas de Laboratorio” (SENASICA-CENASA 2008).

PONENCIAS

Curso de Actualización sobre Diagnóstico y Vigilancia Epidemiológica de FPC. (CENASA 1993).

Taller de Diagnóstico de FPC, por la Técnica de Inmunofluorescencia Directa (CENASA 1999).

Como es sabido a la Dirección General de Salud Animal (DGSA) le corresponde promover la salud de los animales a través de la utilización de biológicos veterinarios cada vez mas potentes, seguros e inoctrinos, debido a las funciones que realiza en el área de vacunas y reactivos se presenta la oportunidad de iniciar el trabajo encaminado a desarrollar los procedimientos técnicos para la constatación de vacunas contra la Enfermedad de Aujeszky ya que además de parecerme un tema relevante, también se estará dando seguimiento a la Normatividad en cuanto a salud animal se refiere.

Es importante para nosotros describir las funciones y actividades del personal del CENASA, así como su estructura funcional a fin de comprender de mejor manera los procedimientos técnicos para la evaluación de éste producto biológico, ya que la principal función de CENASA es apoyar a los laboratorios y a los productores pecuarios, dando seguimiento a las normas NMX-17025; ISO 9001:2000 en beneficio de los mexicanos.

a) HISTORIA DEL CENASA.

El Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) a través de la Dirección General de Salud Animal (DGSA) le corresponde normar y vigilar el cumplimiento de las acciones encaminadas a promover la salud animal, mediante las Campañas Zoonositarias, vigilancia epidemiológica, control de movilización de animales y sus productos entre otros, ayudando con esto a mantener y proteger la salud pública y la economía del país.

Los recursos económicos y humanos que la DGSA canaliza por medio de las campañas para el control y la erradicación de las enfermedades que afectan a los animales domésticos, podrían resultar infructuosos si no se contara con la infraestructura instalada para constatar los resultados obtenidos como los laboratorios de referencia.

Es así que en 1933 la Secretaría de Agricultura y Fomento crea una oficina de Sanidad Animal que constituye el antecedente estructural de la Dirección General de Salud Animal. En el año de 1948, cuando ya se había declarado el estado de “Emergencia Nacional” por el brote de Fiebre Aftosa, la Comisión Nacional de Lucha contra la Fiebre Aftosa adquirió un predio conocido como “El Potrero” el cual formaba parte de la Hacienda de Santa Ana, ubicada en Tecámac, Estado de México; en éste se instaló una estación cuarentenaria para el ganado que iba a reponer los animales sacrificados en la Campaña Nacional contra la Fiebre Aftosa.

En 1967 se crea la Red Nacional de Laboratorios de Diagnóstico en Salud Animal (RENALDI) para dar soporte técnico-científico al diagnóstico de las enfermedades de los animales domésticos.

El Laboratorio Central Nacional formaba parte de dicha red y se ubicaba en el Laboratorio 3 dentro de las instalaciones del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias (INIP), en el kilómetro 15.5 de la Carretera Federal México-Toluca, Palo Alto, D. F. Dicho laboratorio además de realizar el diagnóstico de las enfermedades de los animales domésticos, servía de apoyo a los laboratorios de la RENALDI.

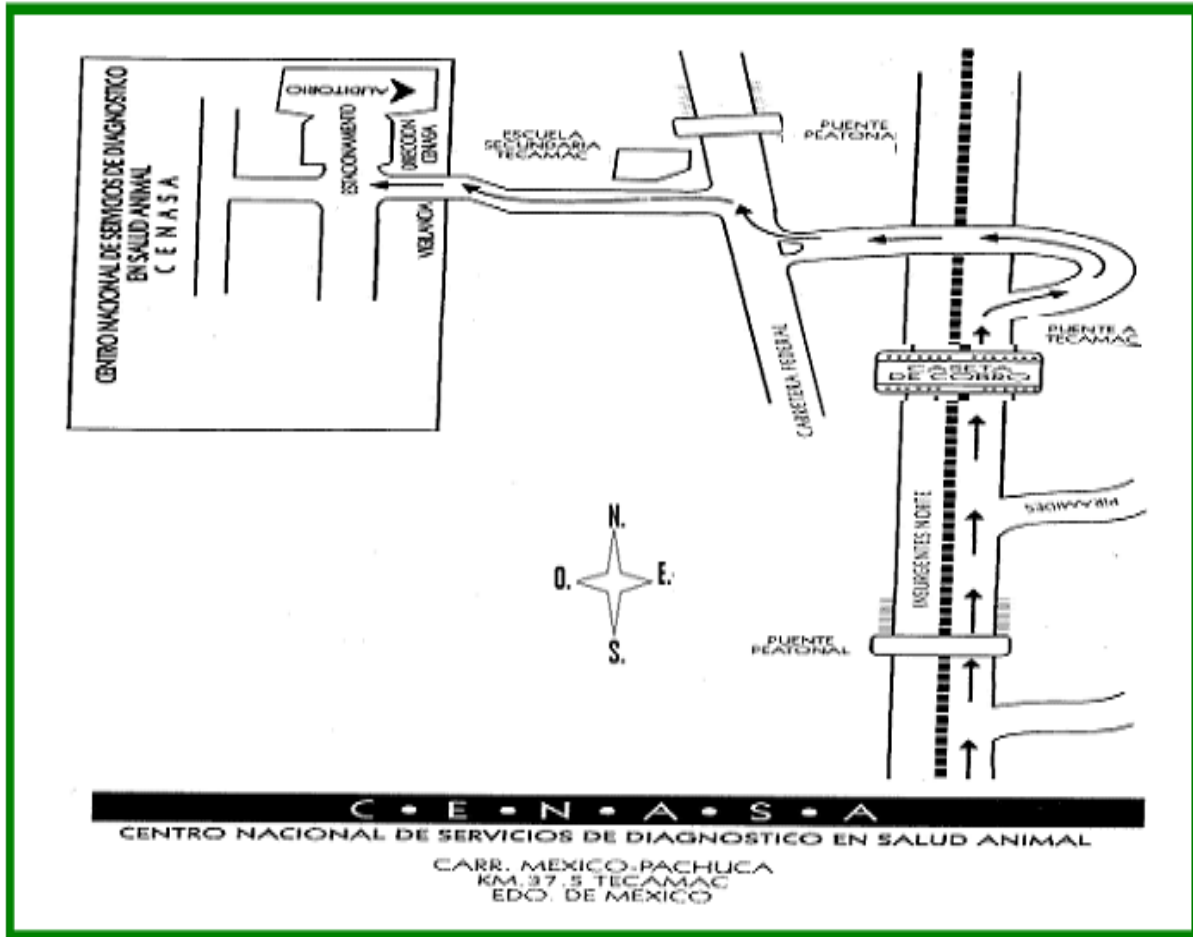
El continuo desarrollo de la RENALDI creó la necesidad de instalaciones más amplias que permitieran la implementación de un laboratorio de referencia acorde a las necesidades de nuestra ganadería.

En 1970 dicho predio fue designado para la construcción del Laboratorio Central Nacional, poniéndose la primera piedra en 1971 y que posteriormente se convirtió en el CENASA. (CENASA 1974-1999).

El predio colinda al norte, en trescientos noventa y seis metros, con camino vecinal de por medio con el rancho “Las Abejas”; al sur, en trescientos ocho metros, con terrenos propiedad de Jesús M. Marroquín y señora; al este, en seiscientos veintiún metros, con derecho de vía del ex-ferrocarril de Hidalgo; al oeste, en seiscientos cincuenta y tres metros, con terrenos sobrantes del predio de “Rancho Nuevo” propiedad de Jesús González de Cosío (Acuerdo SARH-SSA. 1993).

El CENASA está ubicado al norte del Distrito Federal a 2260 metros sobre el nivel del mar, en el km. 37.5 de la carretera México-Pachuca, Tecámac, Estado de México (Granillo 2006. Ver figura 1).

FIGURA 1. UBICACIÓN DEL CENTRO NACIONAL DE SERVICIOS DE DIAGNÓSTICO EN SALUD ANIMAL.



(Fuente: CENASA 1974-1999)

El 11 de Marzo de 1974 inicia sus funciones con un solo edificio. En la actualidad cuenta con una superficie de 23 hectáreas donde 17 174 metros cuadrados están edificados. En este mismo año se amplió el proyecto de construcción y cambia su nombre a Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal.

El CENASA ha venido funcionando desde su inicio como el Laboratorio de Referencia Nacional, por el alto nivel de especialización de su personal así como por la diversidad y precisión en las pruebas que practica (CENASA 1974-1999). Su objetivo principal es contribuir a la vigilancia y protección de la salud de los animales productores de alimentos; aplicando procedimientos de constatación de productos biológicos, estandarizados a nivel internacional, los cuales son revisados continuamente para garantizar resultados de elevada precisión y confiabilidad.

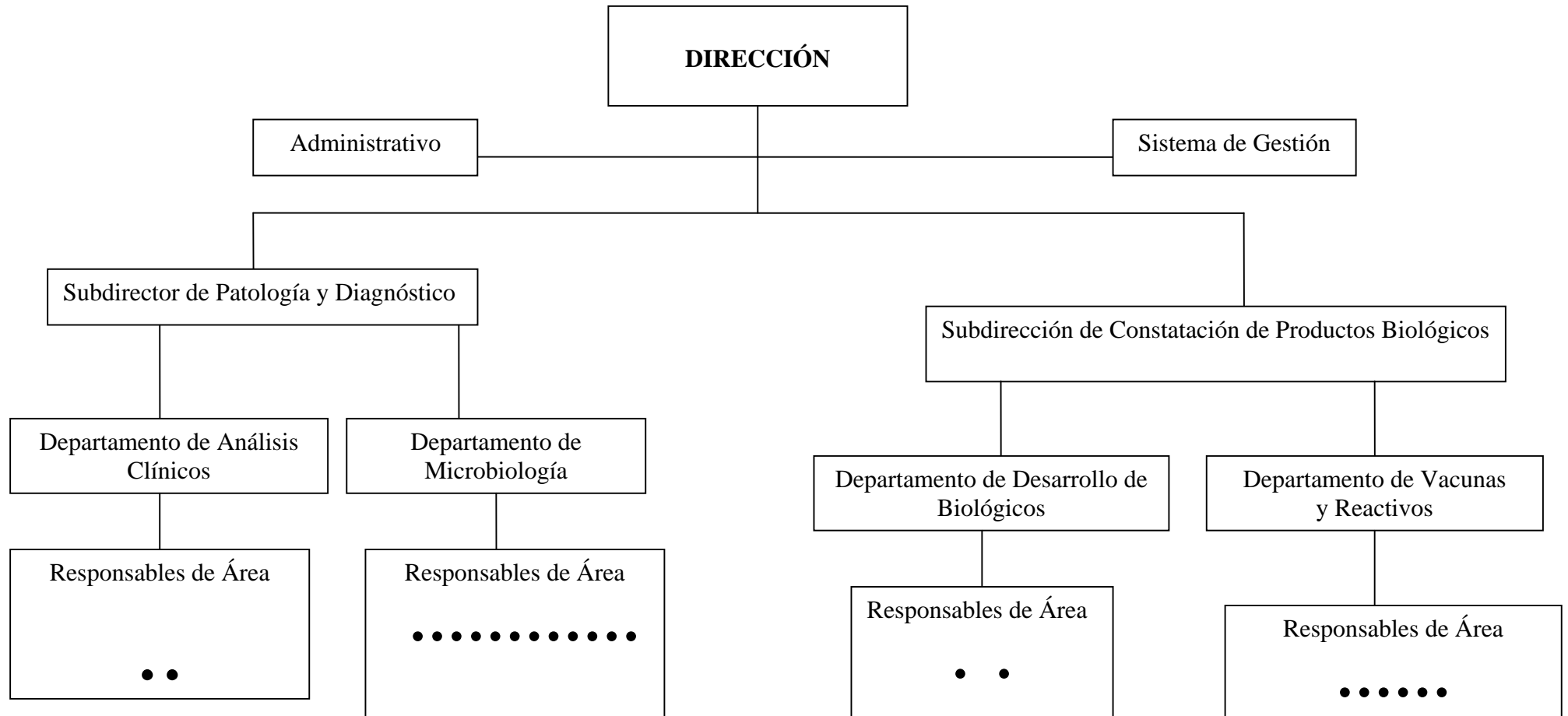
2. EL CENASA Y SU ESTRUCTURA.

El CENASA es una institución perteneciente al Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) de la Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación (SAGARPA). Y funciona de acuerdo al siguiente organigrama: Dirección, Subdirección de Patología y Diagnóstico, Subdirección de Constatación de productos Biológicos y cuatro jefaturas de departamento, un área administrativa y un área de Sistema de Calidad (ver diagrama 1).

El departamento de vacunas y reactivos consta de 6 áreas que están distribuidas por especie (ver diagrama 2):

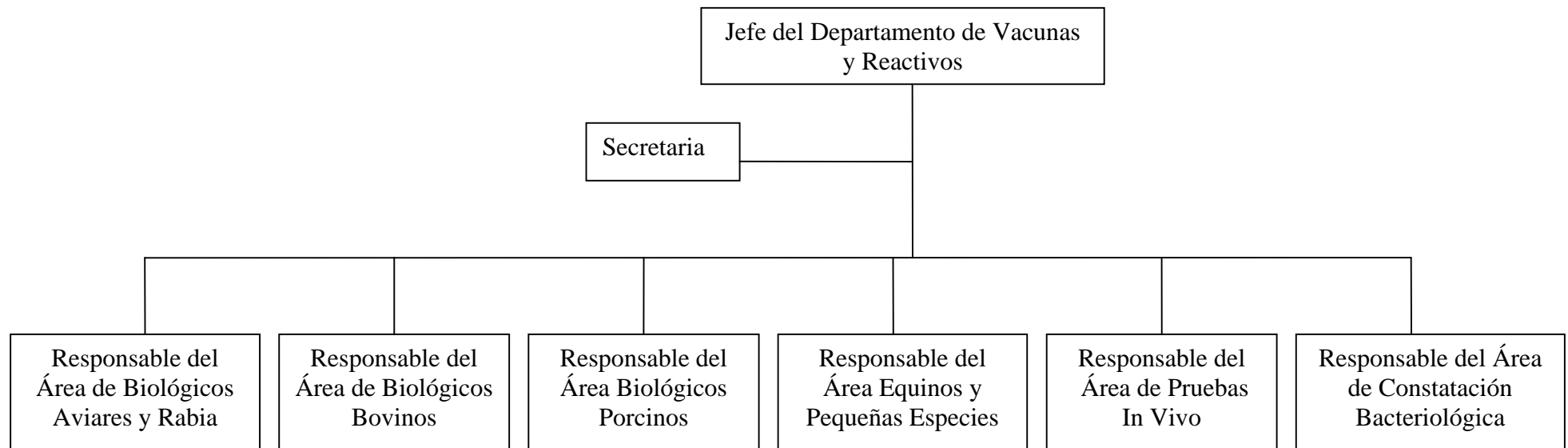
- Área de biológicos aviares y rabia.
- Área de biológicos bovinos.
- Área de biológicos porcinos.
- Área de equinos y pequeñas especies.
- Área de pruebas in vivo.
- Área de constatación bacteriológica.

DIAGRAMA 1. ORGANIGRAMA DEL CENASA



(Fuente: CENASA 2007)

DIAGRAMA 2. ORGANIGRAMA DEL DEPARTAMENTO DE VACUNAS Y REACTIVOS



(Fuente: CENASA 2007)

DESCRIPCIÓN DE FUNCIONES DEL PERSONAL DEL DEPARTAMENTO DE VACUNAS Y REACTIVOS.

FUNCIONES.

- Coordinar el desarrollo de las técnicas del área asignada.
- Detectar necesidades de capacitación en el personal técnico.
- Desarrollar los procedimientos técnicos del área asignada.
- Colabora en la implementación del Sistema de Gestión de la Calidad en el laboratorio.
- Solicita los materiales, reactivos y equipos del área.
- Participar en las diferentes actividades que le sean solicitadas para el buen funcionamiento del CENASA.
- Impartir capacitación al personal interno y externo.
- Supervisar continuamente el cumplimiento del Sistema de Gestión de la Calidad.
- Identificar e informar incumplimiento al Sistema de Gestión de la Calidad, con la finalidad de realizar las acciones correctivas necesarias.

OBJETIVO: Desarrollar, ejecutar y supervisar que las pruebas de constatación se realicen aplicando las técnicas correspondientes y que se cumpla con los procedimientos específicos establecidos en el sistema de Gestión de la Calidad.

Su función principal es la constatación de productos biológicos de uso veterinario, aplicando tecnología de vanguardia, en instalaciones certificadas, con equipo eficiente y personal calificado, que fortalezca la salud animal y asegure que los productos biológicos que se comercialicen en México reúnan las condiciones de pureza, seguridad, inocuidad y potencia (CENASA 2007).

MISIÓN.

El CENASA mediante un adecuado uso de la tecnología mantiene un sistema de referencia vigente, oportuna y confiable para la constatación de productos biológicos de uso veterinario, como apoyo a la salud animal en beneficio del sector pecuario en México (CENASA 2007).

POLÍTICA DE CALIDAD.

Mantener y mejorar el sistema de gestión de la calidad de la constatación de productos biológicos de uso veterinario realizado por personal capacitado; en apoyo a los productores de biológicos para uso veterinario y laboratorios de prueba en cumplimiento de las normas NMX-17025, ISO 9001: 2000 y las vigentes en materia zoonosanitaria, en beneficio de la población mexicana (CENASA 2007).

3. GENERALIDADES.

3.1 ENFERMEDAD DE AUJESZKY.

3.1.1 HISTORIA.

La primera comunicación de esta enfermedad fue hecha en Hungría por Aujeszky en 1903. Hanson en 1954 sugirió que la enfermedad se ha presentado en los Estados Unidos desde 1813. Al principio se le confundía clínicamente con la rabia. Shope en 1931 realizó la identificación serológica del virus de Aujeszky. Traub en 1933 fue el primero en comunicar la replicación del virus en cultivos celulares. En México en 1945 Bachtold la detectó en bovinos de Aguascalientes. En 1961-1962 hubo brotes severos en Indiana, Estados Unidos, después en 1969-1971 Martell y colaboradores detectaron en México brotes epizooticos en cerdos de Michoacán y en bovinos de Guerrero. A partir de 1970 la incidencia aumentó gradualmente en Europa y de 1973 a 1974 también aumentó en los Estados Unidos. Paralelamente, en México, la incidencia de casos de Aujeszky ha aumentado paulatinamente. Es muy probable que esto se deba a que en México los pies de cría son importados de los Estados Unidos (Ramírez, Pijoan 1987).

3.1.2 DEFINICIÓN.

La enfermedad de Aujeszky o seudorrabia, es una enfermedad infectocontagiosa, producida por un herpesvirus, que afecta a la mayoría de las especies domésticas como: bovinos, ovinos, caprinos, caninos y felinos, además de algunos animales silvestres, caracterizada por un intenso prurito local, curso agudo y evolución mortal. En el cerdo, que es el principal reservorio de la infección, cursa como enfermedad generalizada febril, con un cuadro de encefalomielitis o de forma inaparente (Cubero, León 2004). Esta enfermedad se caracteriza por afectar principalmente los sistemas nervioso, respiratorio y reproductor (Hans, Klaus 2001).

3.1.3 DISTRIBUCIÓN.

Su distribución es a nivel mundial, se le ha detectado en Europa, Estados Unidos, Irán, Medio Oriente, Centroamérica, Sudamérica, Brasil, India, Asia Suroriental, Taiwán, Nueva Zelanda, África del Norte, China, Irlanda del Norte, Inglaterra. No se ha detectado en Japón ni en Australia. En México se ha diagnosticado en Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Estado de México y Michoacán (Ramírez, Pijoan 1987).

3.1.4 ETIOLOGÍA.

El agente causal de esta enfermedad pertenece a la familia Herpesviridae, género Alfa-Herpesvirus (herpes virus porcino 1, HVP1). Su morfología es esférica, de 80-100 nm, con simetría icosaédrica, ADN, cápside hexagonal con 162 capsómeros dispuestos radialmente y envoltura lipoprotéica. Es muy resistente a factores ambientales, ya que resiste varias semanas a temperatura ambiente. El tiempo frío y húmedo predispone a la aparición de brotes, son frecuentes en otoño e invierno. Sin embargo, es sensible a los desinfectantes habituales, preparados de cloro y formaldehído (Cubero, León 2004).

Este virus resiste valores de pH entre 5 y 9 y una temperatura de hasta 60°C, resiste bien la congelación (excepto entre -10 y -13°C). Puede sobrevivir durante varias semanas en los cadáveres y en las secreciones en general (Hans, Klaus 2001).

3.1.5 ESPECIES SUSCEPTIBLES.

La Enfermedad de Aujeszky se considera una enfermedad del cerdo por el hecho de que en las otras especies la incidencia es baja, se dan casos aislados y la enfermedad termina con la muerte del animal. El cerdo adulto es muy resistente, presentando en muchas ocasiones infecciones de tipo subclínica. Es por esto, que el cerdo es el único animal que actúa como reservorio de la enfermedad (Porcicultura 2008).

Cuadro 1. Especies susceptibles al virus de la Enfermedad de Aujeszky

Animales	
Silvestres	Domésticos
Ciervo	Cabra
Coatí	Cerdo
Coyote	Conejo
Jabalí	Gato
Mapache	Borrego
Rata	Perro
Ratón	Vaca
Tejón	

(Porcicultura 2008)

3.1.6 PATOGENIA.

La transmisión puede ser en forma directa e indirecta. En forma directa la mayoría de las veces se da por vía oronasal o por vía genital (monta natural, inseminación artificial, a través de semen infectado). Existe transmisión del virus por vía transplacentaria. También los lechones se pueden infectar al momento del nacimiento en el canal del parto, durante la lactación, a través de la leche y por contacto directo con la madre. Puede existir transmisión durante la transferencia de embriones de cerdas donantes infectadas a cerdas sanas.

La transmisión indirecta se da principalmente por vía aerógena, al inhalar aerosoles procedentes de granjas donde existen animales que excretan elevadas concentraciones de virus.

También puede producirse la infección al ingerir pienso o agua contaminados con virus; y a través de fomites como: vehículos, botas, ropa y jeringas. Aunque los insectos, parece ser que no juegan un papel importante en la transmisión del virus, las moscas pueden actuar como vectores mecánicos en la transmisión de la enfermedad entre una y otra granja (Porcicultura 2008).

El virus penetra en el organismo principalmente por vía oral y nasal, localizándose en el anillo naso-faríngeo, es decir, en fosas nasales, tonsilas, ganglios submaxilares, retrofaríngeos, subparotídeos y faringe, donde se multiplica y es eliminado por las secreciones nasales entre el 1° y 10° día postinfección.

Es transportado vía linfática hacia los ganglios regionales, sobre todo lumbares y torácicos. También se disemina vía nerviosa, a través de los nervios glossofaríngeo, vago, olfatorio y trigémino, alcanzando el sistema nervioso central y la médula, produciendo los signos clínicos de tipo nervioso.

A partir del sistema nervioso y médula, se disemina vía linfo-hematógena hacia el resto del organismo, encontrándose en aparato respiratorio, gastrointestinal, urogenital, glándula mamaria. Existe una eliminación intermitente a dosis pequeñas durante 1 o 2 semanas por secreciones respiratorias, heces, orina, semen y leche (Cubero, León 2004).

Los principales transmisores del virus de Aujeszky son los cerdos infectados que están aparentemente sanos, y cuando son transportados contaminan otras granjas. En el cerdo es muy importante la edad para determinar su susceptibilidad a la infección, el cuadro clínico y su curso, así como la letalidad. Mientras que los lechones lactantes son muy sensibles y suelen morir en caso de enfermar, en los animales de mayor edad es frecuente observar resistencia o infecciones clínicamente inaparentes, o solo aparecen síntomas respiratorios poco intensos, que casi siempre se pasan por alto, o se atribuyen a alguna otra enfermedad respiratoria.

Cuando los cerdos sobreviven a la enfermedad de Aujeszky, o a una infección inaparente, se produce una inmunidad celular duradera. Esta inmunidad se desarrolla durante la primera semana de la infección, en tanto que la inmunidad humoral se empieza a detectar durante o al final de la segunda semana. En algunos casos algunos cerdos parecen ser incapaces de desarrollar una inmunidad. Cuando se ha establecido la inmunidad no hay replicación del virus, por lo tanto no hay difusión permanente. Sin embargo, el ADN del virus persiste en las células del SNC y de las tonsilas a lo largo de toda la vida del animal, como es típico en todos los herpesvirus. En situaciones de estrés puede reactivarse el genoma vírico y producir una nueva multiplicación viral, dando como resultado la difusión del virus, la cual va a estar dada tanto por los cerdos inmunes como por los no inmunes, pueden ser portadores temporales. Los lechones contagiados, de madres inmunes, no presentan la enfermedad debido a la inmunidad pasiva que

reciben a través del calostro, pero al desaparecer (6-12 semanas) su protección es insuficiente y por lo tanto son sensibles a la infección.

Es habitual que en grandes explotaciones de reproductores y de cebo, se produzca una fluctuación de la población debida a los continuos nacimientos o introducción de animales, y con ello una transmisión de los virus desde los animales aparentemente sanos pero infectados, lo que permite una cadena infecciosa permanente (circulación del virus) que a su vez mantiene las explotaciones crónicamente infectadas. Las vacunaciones no alteran ésta reacción en cadena epidemiológica, simplemente impiden la aparición del cuadro clínico. El virus sólo se puede eliminar con el sistema todo dentro, todo fuera (Hans, Klaus 2001).

3.1.7 CUADRO CLÍNICO.

La enfermedad se manifiesta de 3 formas clínicas diferentes: nerviosa, respiratoria y con trastornos de la reproducción, dependiendo de la cepa del virus, de la dosis infectante y, lo más importante la edad de los animales. Así la forma nerviosa se observa más frecuentemente en cerdos hasta las 9 semanas de vida, mientras que la forma respiratoria lo es en animales de crecimiento-cebo y reproductores (Sánchez 2008).

En las cerdas adultas a veces hay signos respiratorios al principio de la enfermedad, después hay fiebre, anorexia, constipación, depresión, ptialismo y vómito. El virus cruza la barrera placentaria, si la infección ocurre al principio de la gestación habrá reabsorción embrionaria. Si la infección ocurre a los 40 días de gestación, habrá muerte de los productos y a los 60-80 días se podrán presentar casos de aborto en las cerdas infectadas. Si la infección se presenta al final de la gestación, se puede retardar el parto hasta por 17 días y habrá fetos macerados, nacidos muertos, otros cerditos podrán nacer y permanecer aparentemente normales; éstos se pueden infectar con el virus presente en la leche materna. Aproximadamente el 20% de las hembras reproductoras recuperadas de un brote quedarán infértiles por un periodo estral (Ramírez, Pijoan 1987). En explotaciones con cierto nivel de inmunidad, la enfermedad se presenta solo en algunas camadas o en algunos lechones de la camada (Sánchez 2008).

En cerdos de hasta 9 semanas de edad los signos clínicos de la enfermedad aparecen tras un corto período de tiempo (2 a 4 días), mostrando apatía, anorexia y fiebre de 41 a

42°C. Antes de transcurrir 24 horas aparecen los signos nerviosos con temblores, ptialismo, incoordinación y ataxia que progresan a opistótonos, convulsiones. Los cerdos pueden adoptar la postura de “perro sentado”, movimientos en círculo o permanecer decúbito lateral con movimiento constante de los miembros. La muerte suele ocurrir dentro de las 72 horas de iniciados los signos clínicos. La mortalidad y morbilidad es del 100% en animales de 0 a 2 semanas y puede llegar al 50% en cerdos de 3 a 9 semanas.

En cerdos en crecimiento-cebo y adultos los signos clínicos aparecen tras un periodo de incubación de 3 a 6 días, los animales muestran depresión, anorexia y fiebre de 41 a 42°C. Los signos respiratorios comienzan con rinitis que se acompaña con descarga nasal, estornudos y que puede progresar a neumonía.

Los signos nerviosos solo se manifiestan en algunos animales. La morbilidad llega al 20%, pero la mortalidad, si no hay complicaciones con *Pasteurella multocida* o *Actinobacillus pleuropneumoniae* no suele pasar del 1-2%. Cuando desaparece la fiebre los animales se recuperan (Sánchez 2008), pero nunca alcanzan su peso normal (Ramírez, Pijoan 1987). En los sementales afectados se observa una inflamación testicular y trastornos de la maduración de los espermatozoides (Hans, Klaus 2001).

3.1.8 LESIONES MACROSCÓPICAS.

Las lesiones están ausentes o son mínimas y no se detectan, especialmente en la forma nerviosa. Si están presentes ayudan al diagnóstico cuando se combinan con la historia clínica y los signos clínicos.

Hay rinitis serosa o serofibrinosa, puede pasar desapercibida. Las lesiones se pueden extender a laringe y tráquea, ganglios regionales inflamados y hemorrágicos. Las lesiones pulmonares varían desde edema pulmonar a pequeños focos de necrosis, hemorragias y/o neumonía. Frecuentemente se observa una queratoconjuntivitis.

Las lesiones más características son focos de necrosis que a veces se pueden observar en hígado y bazo, a modo de pequeños puntos de color muy pálido, son más frecuentes en cerdos que no tienen inmunidad pasiva.

Las cerdas que recién han abortado presentan una endometritis catarral con engrosamiento de la pared del útero. Los fetos abortados pueden aparecer frescos,

macerados o parcialmente momificados. En fetos o cerdos neonatos infectados no son frecuentes los focos de necrosis, pero cuando se presentan, son muy sugestivos de esta enfermedad. En verracos se puede observar un ligero aumento de la bolsa testicular debido a un edema escrotal (Sánchez 2008).

3.1.9 LESIONES MICROSCÓPICAS.

Las lesiones en SNC persisten durante muchas semanas (12 a 24 postinfección), incluso en infecciones inaparentes, pero pueden no estar presentes en fetos abortados. Se desarrolla una encefalitis o meningoencefalitis no purulenta muy característica, con degeneración neuronal, satelitosis, manguitos perivasculares y acúmulos de células gliales. Las lesiones se pueden observar tanto en sustancia gris como blanca y su distribución depende de la vía de entrada del virus en el SNC.

En tonsilas, la necrosis comienza en las áreas subepiteliales y se extiende al epitelio y tejido linfoide.

Las lesiones en el aparato respiratorio se caracterizan por la presencia de necrosis del epitelio e infiltraciones en la submucosa de las vías de conducción superiores, además hay bronquitis, bronquiolitis, alveolitis necrótica en pulmón acompañada de edema.

Los focos de necrosis están rodeados por escasas células inflamatorias o están ausentes. Son mas frecuentes en hígado, bazo, ganglios linfáticos y glándulas adrenales, pero también pueden observarse en otros órganos.

La infección uterina se caracteriza por endometritis, vaginitis linfocitaria, placentitis necrótica, mientras que en los verracos hay periorquitis exudativa con lesiones necróticas e inflamación en la túnica albugínea. Hay degeneración del epitelio de los túbulos.

Hay cuerpos de inclusión intranucleares en neuronas, astrositos y oligodendrocitos, pero son más frecuentes en lesiones orgánicas fuera de SNC, especialmente en los márgenes de los focos de necrosis (Sánchez 2008).

3.1.10 RESPUESTA INMUNE.

Durante la infección, las primeras líneas de defensa de los mecanismos inespecíficos de reacción orgánica esta representada por las células asesinas (NK cells) e interferón. La inmunidad mediada por anticuerpos se manifiesta por la presencia de IgM e IgG en el suero entre 5 y 6 días postinfección; la primera alcanza su nivel máximo entre los 9 y 10 días, luego disminuye, y la segunda entre los días 10 y 15, para luego permanecer constante. Los anticuerpos neutralizantes aparecen a los 7 días postinfección, alcanzando su pico máximo en aproximadamente 2-3 semanas, permaneciendo luego por varios meses. La IgA en la mucosa nasal e intestinal, aunque con débil actividad neutralizante, tiene una vida media corta.

La inmunidad celular es sumamente importante, los linfocitos T (LT) sensibilizados diferenciados en células inmunes específicas, efectoras o LT citotóxicos y LT de memoria, cumplen su función de diferentes maneras.

Por un lado producen sustancias solubles denominadas linfoquinas, linfotoxinas e interferón, o bien producen lisis de las células que contienen en su superficie SHV-1 citotoxicidad específica. En presencia de anticuerpos, linfocitos no sensibilizados, macrófagos y PMN, pueden producir lisis en células con virus en su superficie (citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos). Además por su efecto inmunosupresor, SHV-1 aumenta la severidad de las infecciones bacterianas pulmonares producidas por *Pasteurella multocida* o *Streptococcus suis* (Echeverría 2000).

3.1.11 DIAGNÓSTICO.

El diagnóstico de la Enfermedad de Aujeszky se basa principalmente en la historia clínica, signos clínicos, lesiones macro y microscópicas, así como también análisis serológicos y virológicos (Boehringer 2001).

Existen un gran número de metodologías específicas para el diagnóstico de esta enfermedad. Este diagnóstico está basado, como en la mayoría de las enfermedades virales, en el aislamiento e identificación del virus, mediante la detección del antígeno o del ácido nucleico viral, o en la detección de anticuerpos específicos en suero.

Las muestras de elección que se deben enviar al laboratorio son las siguientes: suero, amígdalas, encéfalo, médula espinal, ganglio trigémino, pulmón y bazo (Sánchez 2008).

Aislamiento del virus.

La técnica de aislamiento viral (AV), está considerada como el método de mayor sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de la Enfermedad de Aujeszky. La infección de células susceptibles por ADV provoca un efecto citopático en la célula infectada. Para la identificación del virus, generalmente se aplican sobre los cultivos celulares infectados, técnicas de detección de antígenos o ADN viral, con el fin de diferenciar este efecto citopático del originado por otros virus o factores tóxicos inespecíficos.

Las técnicas más utilizadas para la detección de antígenos virales son: Inmunofluorescencia directa (IFD), Inmunohistoquímica directa e indirecta, Técnica de IPMN (Inmunoperoxidase monolayer assay).

Detección de antígenos virales

a) Inmunofluorescencia directa.

Se realiza a partir de cortes o improntas de tejidos de animales sospechosos. La muestra de elección son las amígdalas, aunque también pueden emplearse muestras de cerebro o improntas faríngeas. Esta técnica tiene la ventaja de ofrecer el resultado en una hora y los resultados en el caso de muestras procedentes de lechones recién nacidos con síntomas clínicos son comparables a los obtenidos por aislamiento viral. Cuando las muestras proceden de animales adultos la sensibilidad de la IFD es muy inferior al AV, por lo tanto un resultado negativo de IFD en animales adultos debe confirmarse siempre mediante AV.

b) Inmunohistoquímica.

Las técnicas de Inmunohistoquímica tanto directa como indirecta permiten la detección de antígenos virales en las fases agudas de infección. Se aplican de forma similar a la IFD, sobre tejidos previamente fijados e incluidos en parafina, realizando el revelado con un complejo de peroxidasa-anti-peroxidasa, o de avidina-peroxidasa. Su ventaja radica en que permite localizar y diferenciar las lesiones producidas por ADV, de aquellas producidas por otros patógenos secundarios.

c) IPMA (inmunoperoxidase monolayer assay).

Esta técnica está basada en la inoculación de células susceptibles con el material sospechoso e inmunoreacción con un suero específico anti-ADV, permite la detección específica del virus sobre los cultivos infectados. Es muy sensible y permite obtener un resultado en dos días.

Detección del ácido nucleico viral

a) Técnica de PCR.

Es una técnica de sensibilidad muy elevada, que detecta cantidades mínimas del agente infeccioso en cualquier tipo de muestra y tejidos del animal en tan solo unas horas, en estadios muy tempranos, en infecciones ya establecidas, en presencia de elevados niveles de anticuerpos neutralizantes. La PCR puede analizar muestras donde el virus ya no se encuentre viable o sea difícil realizar su aislamiento, como el semen. La utilización de la PCR también nos permite detectar el virus en estado latente (donde no hay expresión de antígenos virales).

Detección de anticuerpos.

Las técnicas serológicas son las más utilizadas para la detección del ADV en una explotación, y constituyen la base del diagnóstico de laboratorio en las campañas de control y erradicación.

Existen un gran número de metodologías para la detección de anticuerpos específicos frente a ADV. En la actualidad las técnicas más utilizadas para la detección de anticuerpos de ADV son la virusneutralización, la aglutinación en látex y el ELISA.

En los países que están llevando a cabo programas de vacunación-erradicación con vacunas marcadas, solamente utilizan la técnica de ELISA diferencial, única capaz de diferenciar entre una respuesta de anticuerpos producidos por vacunación o por infección.

a) Virusneutralización.

La técnica de virusneutralización (VN) es muy sensible y se utiliza fundamentalmente para la confirmación de casos positivos. Se basa en la detección de anticuerpos neutralizantes en el suero de los animales sospechosos, que son producidos frente a las glicoproteínas gB, gC y gD, presentes tanto en las cepas del virus de campo como en las cepas vacunales, incluyendo las vacunas de subunidades. Mediante esta técnica se detectan animales positivos a partir del 8°-10° día post-infección, además está considerada como la técnica de referencia para la detección de anticuerpos de ADV.

b) Prueba de aglutinación en látex.

Detecta anticuerpos específicos frente al virus, por aglutinación de partículas de látex recubiertas de glicoproteínas del virus. Es la técnica más sencilla y rápida, que permite en sólo 10 minutos obtener un resultado.

c) ELISA.

Es sin duda la técnica serológica más utilizada por su alta sensibilidad y especificidad y la posibilidad de realizar en pocas horas estudios sobre grandes poblaciones de manera rápida sencilla y económica.

Se han desarrollado diferentes métodos de ELISA, de tipo indirecto, de bloqueo o competición. En general, todos se correlacionan bien con la prueba de Virusneutralización, siendo incluso algo más sensible que este último, ya que permiten detectar un mayor rango de anticuerpos, que incluye los anticuerpos no neutralizantes, y sueros débilmente positivos. En el caso de lechones, la interpretación de resultados puede complicarse debido a la presencia de anticuerpos maternos en el suero.

Cuando se aplican programas de vacunación con vacunas gE-, es necesario utilizar técnicas de ELISA diferencial para detectar los animales infectados. Hoy en día, las pruebas que se realizan están basadas en técnicas de competición, que detectan la presencia de anticuerpos anti-gE en suero, ya que son las vacunas gE- las más utilizadas en el mercado mundial. Existen otras pruebas comerciales que se utilizan para analizar la respuesta serológica frente a otra proteína muy inmunogénica y esencial del virus, la glicoproteína gB, presente tanto en el virus de campo como en las vacunas marcadas

vivas e inactivadas gE- actuales, lo que permite conocer cual es el estado inmunológico de los animales vacunados.

En algunas ocasiones, la interpretación de los resultados obtenidos en estas pruebas, pueden presentar algunos problemas, debido a la aparición de resultados falsos positivos (baja especificidad) o falsos negativos (baja sensibilidad).

Perfiles serológicos.

La realización de muestreos serológicos seriados (seroperfiles), aportan valiosa información sobre la situación de una explotación, además son de gran utilidad si se realizan antes de elaborar un programa de vacunación y así también poder evaluar la eficacia del mismo.

Los perfiles serológicos representan un importante medio para aumentar el control sanitario y reducir las pérdidas ocasionadas por un estado sanitario deficiente. Los seroperfiles se utilizan para prevenir la entrada de enfermedades, para elegir el momento más adecuado de la primera vacunación de los lechones, y para evaluar la respuesta inmune de las poblaciones vacunadas (Sánchez 2008).

3.1.12 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.

Las manifestaciones nerviosas de la Enfermedad de Aujeszky se deben diferenciar de la peste porcina clásica y la meningitis estreptocócica. En la PPC la enfermedad afecta a cerdos de todas las edades y no más gravemente a los animales más jóvenes, como ocurre con los herpesvirus. El curso clínico de la enfermedad, una vez que han aparecido las manifestaciones nerviosas, es más prolongado en la PPC que en la EA. Microscopicamente, las lesiones en el SNC varían especialmente entre las dos enfermedades ya que al ser el VPPC un virus somatotropo las lesiones son posteriores y limitadas a los manguitos perivasculares, no afectándose inicialmente las neuronas, mientras que el ADV es un virus neurotrofo y se desarrolla una típica reacción encefalítica con degeneración y necrosis neuronal, acúmulos de células gliales, manguitos perivasculares, espongiosis y cuerpos de inclusión intranucleares (Sánchez 2008). En los lechones lactantes también se debe diferenciar de la enfermedad de los temblores, enfermedad de Teschen, y del temblor por frío en la hipoglucemia y en la hipotermia. En la enfermedad de los temblores, y la enfermedad de Teschen el sensorio no esta alterado como en el caso de la Enfermedad de Aujeszky, en la hipoglucemia y

la hipertermia los lechones están apáticos y presentan poca actividad motora. Tanto en la enfermedad de Teschen como en la peste porcina típica predominan las claudicaciones de las extremidades posteriores o ataxia, y en la enfermedad de Teschen también hay parálisis. Lo que no sucede con la enfermedad de Aujeszky. En los lechones destetados además de establecer un diagnóstico diferencial con la peste porcina y la enfermedad de Teschen, también debe establecerse con las intoxicaciones por sal o por mercurio y las colienterotoxemias. Los ataques espásticos que aparecen en la intoxicación por sal, sialorrea y la alteración del sensorio son similares a los que presenta la Enfermedad de Aujeszky, tomando en cuenta que la presentación de la EA en cerdos de más edad generalmente es asintomática (Hans, Klaus 2001).

Las manifestaciones respiratorias de la EA se deben diferenciar de otras enfermedades respiratorias del cerdo, especialmente de la Influenza porcina. En este caso tiene gran importancia la historia clínica, así como también el historial de la explotación, si hay lechones con manifestaciones nerviosas, si ha habido abortos, etc. (Sánchez 2008).

Por problemas reproductivos también hay que diferenciar la Enfermedad de Aujeszky de otras enfermedades víricas que producen abortos como el PRRS, la parvovirus, etc. En estos casos hay que tener en cuenta el escaso porcentaje de animales afectados (menos del 20%) y comprobar si los fetos presentan focos necróticos, especialmente en hígado y bazo (Sánchez 2008), también se debe diferenciar la EA de brucelosis, leptospirosis y enterovirus (Hans, Klaus 2001).

3.1.13 PREVENCIÓN SANITARIA.

- En las explotaciones donde no existe la enfermedad, evitar introducir cerdos de explotaciones dudosas o, en todo caso, someterlos a cuarentena estricta y a controles serológicos antes de incorporarlos a la explotación.
- Desinfectar periódicamente los locales con sosa cáustica 3%, lechada de cal 20%, formol 1%.
- Control de roedores.
- Eliminación higiénica de cadáveres de lechones y cerdos muertos.

3.1.14 PREVENCIÓN MÉDICA.

La inmunidad adquirida de forma natural, tras haber superado un proceso clínico, aparece a los 10 días, su tasa máxima es a los 15 a 21 días y protege durante toda la vida del animal. La inmunidad alcanzada por el cerdo vacunado se desarrolla en función de su estado inmunitario en el momento en que se produce la vacunación, y también depende de la pausa vacunal y del tipo de vacuna utilizada.

La inmunidad pasiva es adquirida por los lechones a través de la toma de calostro de madres con inmunidad, por infección natural o por vacunación. Esta forma es la más idónea para proteger a los lechones durante las primeras semanas de vida, período en el cual son muy sensibles.

Cuando se produce un brote debe realizarse una vacunación en todos los animales, hayan o no hayan sido vacunados con anterioridad. Una alta concentración de anticuerpos neutralizantes, no solo previene la difusión del proceso en los cerdos expuestos, sino que disminuye las posibilidades de replicación del virus en animales vacunados.

Los cerdos vacunados con una vacuna viva, y en menor grado con una vacuna inactivada, se inmunizan bien previniendo los signos clínicos, sin embargo un virus que sea muy patógeno, puede penetrar en el organismo del animal vacunado, replicarse y excretarse al medio ambiente, sin que se manifieste clínicamente. La vacunación actúa como un agente anti-infeccioso, limitando la replicación del virus en el organismo, acortando el período de excreción y por lo tanto disminuyendo su prevalencia.

La utilización de vacunas inactivadas producen inmunidad tardía, con eficacia insuficiente y su costo es más elevado, sin embargo la aplicación de vacunas vivas se recomiendan solo en casos de alto riesgo, en animales sanos de aquellas explotaciones en las cuales se presenta la enfermedad o en aquellas directamente en riesgo, que estén localizadas en zonas endémicas. En explotaciones con vacunación ésta debe continuar mientras existan animales portadores del virus. No se debe vacunar en explotaciones donde no existe el virus.

Se han utilizado vacunas avirulentas (Bartha), avianizadas (Bucarest), atenuadas (MK-25) e inactivadas (Geskyvac). Actualmente se aplican vacunas inactivadas y atenuadas gpI negativas, con el virus de la enfermedad de Aujeszky al que se le ha extraído el gen que controla la expresión de la glicoproteína I por delección del genoma. De este modo mediante una técnica de ELISA de bloqueo, se pueden diferenciar los anticuerpos vacunales de los producidos por infección natural, que sí poseen la glicoproteína.

La vacunación se realiza, sólo en explotaciones afectadas o con gran riesgo de infección, y consiste en vacunar con vacuna inactivada 1 mes antes del parto. Los lechones se vacunan con 1 mes de edad y se revacunan a los 15 días. Los cerdos de engorda, se vacunan con vacuna viva atenuada 2 semanas antes de entrar a el período de engorda (Cubero, León 2004).

3.1.15 CONTROL Y ERRADICACIÓN.

En México, el control de la Enfermedad de Aujeszky (EA) se ha basado sólo en la vacunación para evitar la mortalidad de los lechones y la realidad es que su efecto ha sido limitado en cuanto a la reducción de la prevalencia. Esto se debe a que en la mayoría de las granjas no se toman muestras a los cerdos que son introducidos para determinar que están libres del virus, por lo tanto de manera constante se introducen animales contaminados.

Se debe implementar un programa de control de la EA en cada granja. Para esto el porcicultor debe estar conciente de las pérdidas económicas que causa, así como también de las ventajas de tener una granja libre de la EA, entre otras:

- Animales con menos brotes de pleuroneumonía, problemas reproductivos y mortalidad.
- Menores gastos por fármacos, estudios de laboratorio o por vacunaciones.
- Mover con libertad los animales, ya sea para venta de sementales o hembras de cría.

Los pasos recomendados para el control de la EA según Thawley y Morrison, 1988; Morrison, 1994 son:

- Realizar un diagnóstico de la situación de la EA en la granja, también el de las piaras cercanas. La prevalencia en cada una de las piaras se establece por medio de la toma de muestras a 30 hembras de cría adultas y 30 cerdos de 4 a 6 meses de edad.
- Localizar cada una de las granjas en un mapa y analizar cómo se encuentra distribuida la EA en la zona.
- De acuerdo a la distribución, se deben establecer medidas para evitar que continúe la infección entre las piaras. Evitar la entrada de cerdos seropositivos, establecer barreras físicas entre las granjas que se encuentren a menos de 3 km de distancia.
- Establecer un programa de control. La prevalencia se reduce por medio de la vacunación con virus atenuado, después se puede eliminar el virus a través de manejo, prueba y eliminación, establecimiento de la granja en 2 o 3 sitios, así como la despoblación y repoblación.
- En zonas densamente pobladas no se recomienda erradicar la enfermedad, ya que con facilidad la piara volverá a infectarse.

En un estudio realizado en México se introdujeron animales de reemplazo libres de Aujeszky y en un periodo de año y medio disminuyó considerablemente la prevalencia.

Se pueden obtener hembras de reemplazo seronegativas de la misma granja infectada, por medio de la separación temprana, para que no se infecten o por medio del sitio único.

Los pasos para obtener las hembras de reemplazo seronegativas son los siguientes:

- Vacunar a las hembras de cría para incrementar la inmunidad materna
- Durante la lactancia seleccionar, por lo menos, una y media vez más el número de hembras requerido para el reemplazo, y destetarlas antes de los 21 días de edad.

- Alojjar a los lechones en instalaciones que se encuentren de preferencia fuera de la granja, para evitar que se infecten, no debe existir contacto con animales, alimento, utensilios o personal que provenga de la granja.
- Sangrar el grupo de hembras cuando tengan de 4 a 5 meses de edad, para determinar si están infectadas con el virus de la EA.
- Si el procedimiento seguido fue correcto, deben ser seronegativas; en caso que se encuentre algún animal seropositivo, se elimina, pero si es más del 10%, se debe eliminar todo el lote y se debe comenzar de nuevo.
- Las hembras seronegativas se pueden introducir a la granja original y se cruzan con un macho, o se inseminan con semen libre de virus de la EA.
- Se debe dar seguimiento a la piara, por medio del perfil serológico.

a) Prueba y eliminación

Consiste en eliminar de manera gradual a hembras y sementales seropositivos de la granja. Este programa se puede implementar si el virus no circula en los cerdos de crecimiento y engorda, además la seroprevalencia en las hembras de cría es baja.

- Tomar muestras a todas las hembras y sementales.
- Establecer un programa que sea factible desde la perspectiva económica, para eliminar de manera gradual a los animales que sean positivos y reducir la prevalencia en la piara.
- Se puede vacunar al pie de cría para reducir el riesgo de que el virus se reactive.
- Es recomendable establecer la inseminación artificial.
- Introducir al pie de cría hembras de reemplazo seronegativas. Para evitar que las hembras negativas se infecten, se recomienda introducir pocos animales a la vez y tratar de reducir el estrés, al mezclarlas con las hembras adultas infectadas.

b) Granja en dos o tres sitios

Con este programa se dividen las etapas de producción de los animales en 2 o 3 granjas separadas entre sí. En el Sitio 1 se mantiene el pie de cría, en el Sitio 2 a los animales de destete y desarrollo, y en el Sitio 3, a los de crecimiento y engorda. Con este sistema, algunos de los microorganismos del pie de cría no pasan a los Sitios 2 y 3, los cuales se convierten en granjas de elevado nivel sanitario. En caso de que se introduzca un germen patógeno a uno de los sitios, se evita que pase a los siguientes.

Las granjas deben estar separadas por lo menos 3 km una de la otra y es necesario que no existan contactos con el personal, animales, alimento o utensilios de los diferentes sitios, para no transferir agentes infecciosos. Por ejemplo, en caso de que se produzca una infección con el virus de la EA en el Sitio 1, se deben vacunar a los sementales y a las hembras de cría, para incrementar la inmunidad materna. Los lechones se destetan entre los 19 y 21 días de edad, y se pasan al Sitio 2, en donde se pueden mantener durante el crecimiento y la engorda (dos sitios). También pueden ser transferidos a una tercera granja para completar la etapa de desarrollo y engorda (tres sitios). Para constatar que el virus no pasó al Sitio 2 o 3, se realiza un muestreo serológico en los animales de 4 a 5 meses de edad, deben ser seronegativos. El objetivo es que en cada transferencia, se eliminen diversos gérmenes, como el virus de la EA. En caso de que se vendan animales para cría, éstos estarán libres del virus de la EA.

c) Despoblación y repoblación

Consiste en eliminar todos los animales de una granja, estén o no infectados con el virus de la EA y repoblar con animales sanos de mayor valor genético.

- Despoblar durante un período de varios meses, conforme los cerdos alcanzan el peso del mercado.
- No se deben mantener a los animales con retraso de crecimiento.
- Las hembras se van eliminando, conforme se destetan y sus lechones se pasan a otra granja.
- Una vez que la granja quedó libre de animales, se limpia, se desinfecta, y no se utiliza durante un período de por lo menos 30 días.
- La repoblación se debe hacer con animales de una piara negativa al virus de la EA y se efectúa un muestreo serológico 30 días después de que hayan entrado a la granja.

d) Monitoreo de hatos libres

Para mantener el estado de piara libre, se debe muestrear una vez al año a todas las hembras de cría y sementales, así como determinar que son seronegativos. Sin embargo, se ha considerado que el muestreo cada año puede ser muy prolongado, en caso de que el virus entre a una piara, puede llegar a infectar un gran número de animales, sin que presenten manifestaciones clínicas (Morilla, 2005).

Se recomienda realizar el muestreo en periodos de 3 meses, se toma el suero del 25% de los animales de cría cada vez y se completa el 100% al año, que es cuando se da el certificado de piara libre, en caso de que se presente el virus, será menor el tiempo transcurrido en detectarlo y se podrán tomar las medidas adecuadas, para evitar que se difunda (Vannier P, comunicación personal).

En la NOM-007-ZOO-1994 Campaña Nacional contra la Enfermedad de Aujeszky existe el estado de granja sin evidencia, en la cual se toman muestras de 30 cerdos de 4 a 6 meses de edad y 30 hembras de cría, y si son seronegativos se puede obtener el certificado de no evidencia de EA, la cual tiene una duración de seis meses.

3.2 VACUNAS CONVENCIONALES.

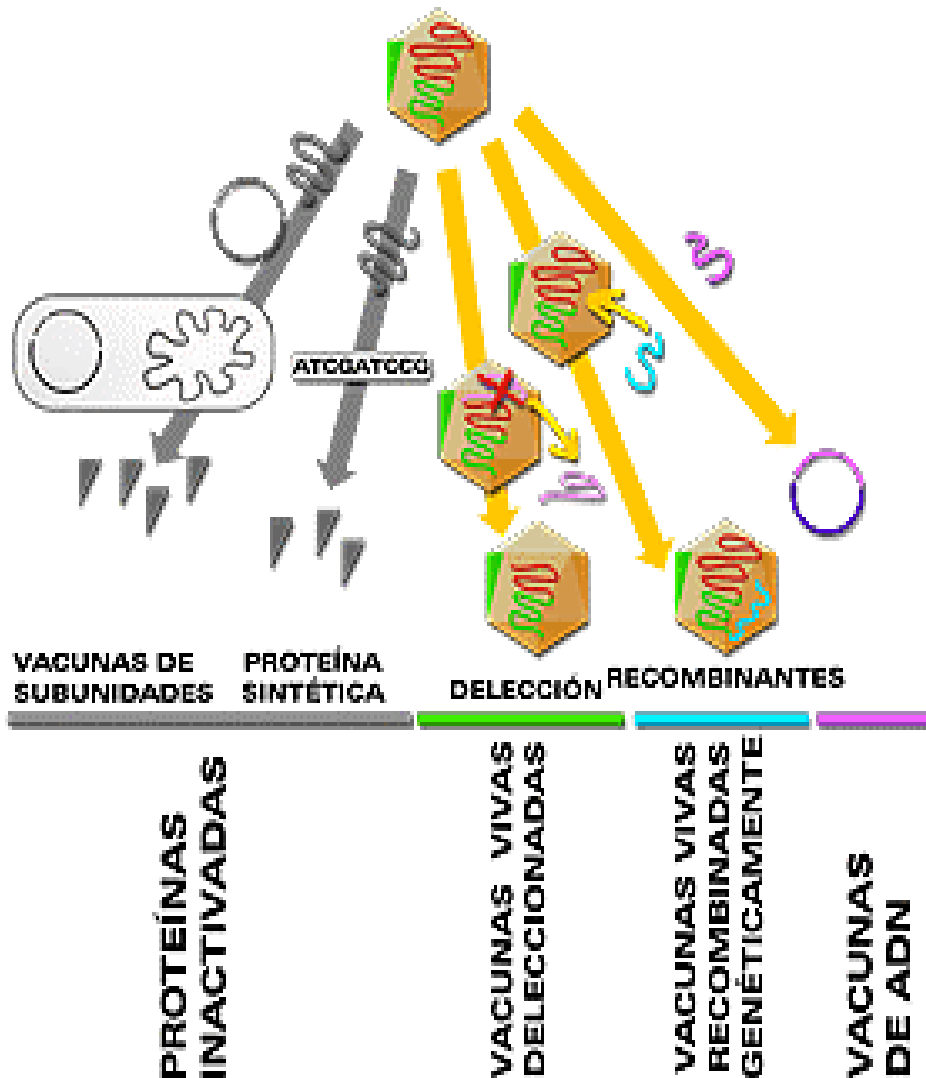
Las vacunas convencionales son la base inmunológica principal para el control de la mayoría de las enfermedades en porcinos, sin embargo presentan algunas desventajas:

- Seguridad: reversión a la virulencia
- Inactivación inadecuada
- Contaminaciones
- Efectos secundarios: fiebre, hipersensibilidad, inmunosupresión
- Cadena fría: refrigeración de 4 a 6°C
- No disponibles para todas las enfermedades
- No diferencian la respuesta inmune entre vacunados y enfermos

Gracias al actual conocimiento de la respuesta inmune frente a los agentes infecciosos y al desarrollo de diferentes técnicas de ingeniería genética se están desarrollando nuevas vacunas (ver esquema 1), que permitan resolver los problemas que se presentan con la utilización de las vacunas convencionales (Sánchez 2004).

ESQUEMA 1. VACUNAS DE INGENIERÍA GENÉTICA.

VACUNAS DE NUEVA GENERACIÓN



En este esquema se observan los diferentes tipos de vacunas elaboradas a partir de ingeniería genética: vacunas a base de fracciones o subunidades, vacunas vivas con deleción, vacunas recombinantes y vacunas de ADN. Es importante mencionar que las vacunas vivas contra la Enfermedad de Aujeszky son vacunas con deleción gE^- (antes $g1^-$).

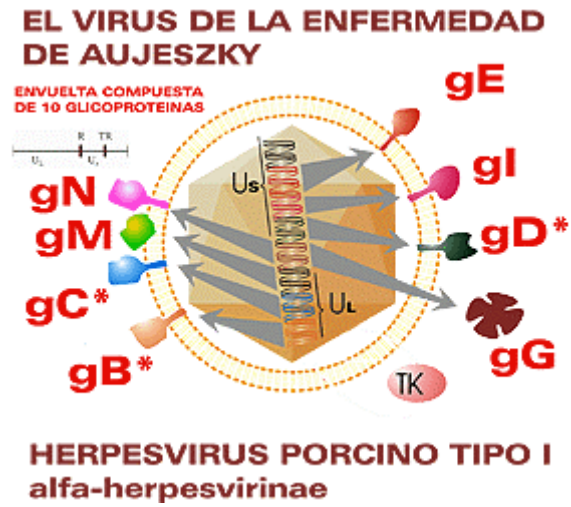
(Fuente: Sánchez 2004)

CUADRO 2. CARACTERÍSTICAS DE LAS VACUNAS DE INGENIERÍA GENÉTICA.

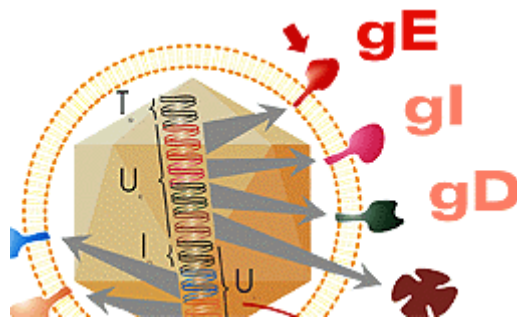
Vacunas de proteínas inactivadas	Subunitarias Proteínas sintéticas	Ésta se basa en la producción de proteínas de un agente infeccioso, mediante técnicas de ingeniería genética, que fragmentan el ADN correspondiente y lo expresan en diferentes vectores.
Vacunas vivas delecionadas	Deleción Virus de la Enfermedad de Aujeszky (Ver esquema 4).	Se eliminan genes que codifican proteínas ligadas a la virulencia como la timidin-kinasa teniendo como resultado cepas atenuadas estables, seguras y marcadas (gE, gC, gG).
Vacunas vivas recombinantes	Recombinantes	Se basa en la utilización de un microorganismo (virus o bacteria) que actúa como vector para expresar genes de otro microorganismo diferente.
Vacunas de ADN		Últimamente se está estudiando la posibilidad de utilizar directamente una fracción de ADN purificado que contenga el gen de la proteína capaz de inducir una respuesta inmune protectora utilizando un plásmido como vector.

(Fuente: Sánchez 2004)

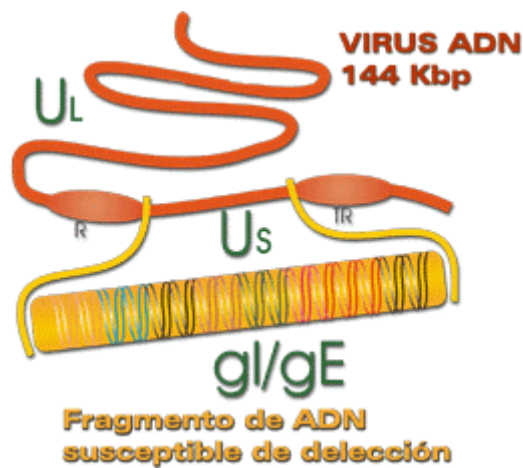
ESQUEMA 2, 3 Y 4 VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE AUJESZKY (VEA).



Esquema 2. Estructura del virión del VEA, su ADN y sus diferentes proteínas (incluye su nueva nomenclatura. Ver cuadro 2).



Esquema 3. Estructura del virión del VEA y localización de sus diferentes proteínas.



Esquema 4. Estructura del ADN del VEA. Y localización de los fragmentos UL y US. (En este último se localizan los genes de las gE y gI susceptibles de delección).

(Fuente: Sánchez .2004)

CUADRO 3. NOMENCLATURA Y CARACTERÍSTICAS DE LAS GLICOPROTEÍNAS PRESENTES EN LA ENVOLTURA DEL VEA.

Glicoproteínas	Nomenclatura		Características
	Antigua	Nueva	
Esenciales	gII	GB	Penetración y diseminación célula célula
	gp50	GD	Adherencia y penetración
	gH	Gh	Penetración y diseminación célula célula
	gK	GK	Diseminación célula célula
	gL	GI	Penetración y diseminación célula célula
No esenciales	gIII	Gc	Adherencia
	gI	GE	Modula la función de diseminación
	gX	GG	Se desconoce su función
	gp63	GI	Modula la función de diseminación
	UL10	Gm	Penetración

(Fuente: Jasso 2005)

CUADRO 4. PRINCIPALES INMUNÓGENOS VACUNALES EMPLEADOS EN LAS VACUNAS COMERCIALES gE-

Principales inmunógenos vacunales empleados en las vacunas comerciales gE-	
Vivas	Inactivadas
Bartha k/61	Bartha k/61
Begonia gE-	Phylaxia gE-
Alfort 26 gE-	Bucarest
NIA-4	NIA-4
NIA3-783	NIA3-783

(Fuente: Jasso 2005)

4. DESCRIPCIÓN DEL DESEMPEÑO PROFESIONAL AÑO 2007.

Para el control y la erradicación de la Enfermedad de Aujeszky (EA), se requieren biológicos veterinarios cada vez más potentes, seguros e inocuos, debido a que en el país no se contaba con dichos biológicos, surge un acuerdo en 1999 entre la Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación (SAGARPA) y la industria privada, para la importación de vacunas vivas contra la (EA).

Cabe mencionar que hasta entonces la normatividad vigente en materia zoonosanitaria (NOM-048-ZOO-1996. Requisitos mínimos para las vacunas contra la Enfermedad de Aujeszky) no contemplaba vacunas de virus vivo, elaboradas a partir de ingeniería genética y las pruebas de control de calidad se realizaban de acuerdo a el protocolo del laboratorio productor, manual OIE, CFR, USA. Es por esto que surge la idea de elaborar los “PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS PARA LA CONSTATACIÓN DE VACUNAS VIVAS CONTRA LA ENFERMEDAD DE AUJESZKY”.

La elaboración de este trabajo tiene como finalidad enriquecer y dar seguimiento a la normatividad mexicana vigente (NOM-048-ZOO-1996), ya que no contempla vacunas de virus vivo elaboradas a partir de ingeniería genética.

El complementar y enriquecer esta norma permitirá contar con biológicos más eficaces, seguros e inocuos para la aplicación de los programas de sanidad animal, además en un mundo globalizado el contar con productos pecuarios procedentes de áreas libres de enfermedades y de un nivel sanitario alto, permite la libre competencia de mercado tanto nacional como internacional, teniendo como resultado un mejor beneficio en la producción pecuaria del país.

A continuación se describen las actividades que se realizaron en el departamento de vacunas y reactivos perteneciente al Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal (CENASA), durante el periodo comprendido de Enero a Diciembre del 2007, donde una de las principales actividades fue la elaboración y realización de las técnicas para la constatación de vacunas vivas contra la Enfermedad de Aujeszky (EA), las cuales sirvieron de soporte para la elaboración de los procedimientos técnicos.

5. PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS PARA LA CONSTATACIÓN DE VACUNAS VIVAS CONTRA LA ENFERMEDAD DE AUJESZKY.

5.1 PRUEBAS IN VITRO.

- a) prueba de determinación de vacío.
- a) Prueba de determinación de humedad.
- b) Prueba de pureza.

***5.1.1 Prueba de identidad por neutralización.**

- c) Prueba de ausencia de virus contaminantes no hemoaglutinantes.

***5.1.2-5.1.3 Prueba de ausencia de virus contaminantes hemoadsorbentes y hemoaglutinantes.**

***5.1.4 Prueba de ELISA anti gB PRV / ADV.**

***5.1.5 Prueba de ELISA gp1.**

***5.1.6 Prueba de seroneutralización.**

***5.1.7 Prueba de titulación.**

5.2 PRUEBAS IN VIVO.

5.2.1 Prueba de potencia.

5.2.2 Prueba de seguridad.

5.2.3 Prueba de cohabitación.

***Pruebas realizadas en el Departamento de Vacunas y Reactivos.**

- a) Pruebas realizadas en el área de fisicoquímicos.
- b) Prueba realizada en el área de esterilidad.
- c) Pruebas realizadas en el área de virología.

***Todos los medios de cultivo y reactivos utilizados en éstas pruebas los proporciona el área de cultivo celular de virología.**

PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS PARA LA CONSTATACIÓN DE VACUNAS VIVAS CONTRA LA ENFERMEDAD DE AUJESZKY.

5.1 PRUEBAS IN VITRO

5.1.1 PRUEBA DE IDENTIDAD POR NEUTRALIZACIÓN.

El objetivo de esta prueba es confirmar que las vacunas contra la enfermedad de Aujeszky están elaboradas con una cepa estandarizada del VEA. Y se basa en la identificación del virus vacunal por medio de la técnica de seroneutralización, esta prueba aplica a los lotes de vacuna importados o producidos en México.

Equipo e instrumentos utilizados

- Bomba de vacío.
- Estufa bacteriológica.
- Microscopio invertido.
- Refrigerador o cuarto frío a 4°C.
- Congelador -20°C.

Materiales

- Microplaca estéril de 24 pozos para cultivo celular.
- Agitador eléctrico automático.
- Gradilla para tubos de vidrio.
- Jeringa de 10 ml desechable.
- Mechero de Bunsen o campana de flujo laminar.
- Gorro y cubre bocas.
- Torundas de algodón.

Reactivos

- Alcohol al 70%.
- Bicarbonato de sodio (NaHCO₃ al 3%).
- L-glutamina.
- Medio esencial mínimo (MEM) para cultivo celular.
- Solución amortiguadora de fosfatos (SAF) pH 7.0-7.2.
- Solución de antibióticos: penicilina, estreptomina y anfotericina B.

- Línea celular estable PK 15 en monoestrato de bajo pasaje.
- Suero de cabra o fetal bovino libre de anticuerpos contra el VEA.
- Antisuero monoespecífico contra el VEA inactivado a 56°C, 30 minutos.
- Vacuna contra la EA.

Preparación y acondicionamiento de la muestra

Reconstituir la vacuna en condiciones estériles.

- 1.- Mezclar igual volumen de virus vacunal con antisuero monoespecífico e incubar a 37° C durante 1 hora.
- 2.- Decantar el medio de la microplaca.
- 3.- Inocular con 0.2 ml de la mezcla vacuna/antisuero dos pozos de una microplaca que contenga monoestrato de células pk15 incubadas a 37°C/48 horas.
- 4.- Inocular con 0.2 ml dos pozos con vacuna sin antisuero y dejar dos pozos como control celular.
- 5.- Incubar 37° C durante 1 hora.
- 6.- Decantar el medio de la microplaca.
- 7.- Adicionar medio de mantenimiento 2 ml por pozo (MEM, NaHCO₃ al 3%).
- 8.- Incubar en cámara húmeda a 37° C durante 7 días.
- 9.- Observar la microplaca en microscopio de luz invertida para evidenciar efecto Citopático (ECP).

El resultado es satisfactorio cuando en los pozos inoculados con la mezcla vacuna-antisuero no se observe efecto citopático.

En los pozos inoculados solamente con la vacuna presenten ECP.

En el control celular no se observe alteración alguna en el monoestrato (Manual OIE 2004).

5.1.2 PRUEBA DE AUSENCIA DE VIRUS CONTAMINANTES HEMOADSORBENTES.

El objetivo principal de esta prueba es demostrar que las vacunas utilizadas en la prevención de la enfermedad de Aujeszky están libres de virus contaminantes específicos como Parvovirus porcino, Rubulavirus porcino y otros agentes extraños, esta prueba aplica a los lotes de vacuna contra la EA producidos en México o importados.

Equipo e instrumentos utilizados

- Bomba de vacío.
- Estufa bacteriológica.
- Microscopio invertido.
- Refrigerador o cuarto frío a 4°C.
- Congelador -20°C.

Materiales

- Microplacas estériles de 24 pozos para cultivo celular.
- Gradilla para tubos de vidrio.
- Jeringa de 10 ml desechable.
- Mechero de Bunsen o campana de flujo laminar.
- Gorro y cubre bocas.
- Torundas de algodón.

Reactivos

- Alcohol al 70%.
- Bicarbonato de sodio (NaHCO₃).
- L-glutamina.
- Medio esencial mínimo (MEM), para cultivo celular.
- Solución amortiguadora de fosfatos (SAF) pH 7.0-7.2.
- Solución de antibióticos: penicilina, estreptomina y anfotericina B.
- Solución de Alsevers.
- Línea celular estable PK15 en monoestrato de bajo pasaje.

- Suero de cabra o suero fetal bovino libre de anticuerpos contra el VEA.
- Antisuero monoespecífico contra el VEA inactivado a 56°C 30 minutos.
- Suspensión de glóbulos rojos de ave y de cuye al 0.1 %.
- Vacuna contra la EA.

Preparación y acondicionamiento de la muestra

Reconstituir un vial de la vacuna contra la EA en condiciones estériles

- 1.- Mezclar igual volumen de virus vacunal con antisuero monoespecífico e incubar a 37° C durante 1 hora.
- 2.- Decantar el medio de las microplacas.
- 3.- Inocular con 0.2 ml de la mezcla vacuna antisuero a cuatro pozos de una microplaca que contenga células PK15 incubadas a 37°C/48 horas y otros cuatro de otra microplaca, dejando dos pozos como control por cada una.
- 4.- Incubar 37°C durante 1 hora.
- 5.- Decantar el medio de ambas microplacas.
- 6.- Adicionar medio de mantenimiento 2.0 ml por pozo (MEM, NaHCO₃ al 3%).
- 7.- Incubar en cámara húmeda a 37 °C de 10 a 14 días.
- 8.- Recolectar en forma estéril fluidos del primer pase e inocular otras dos microplacas que contengan monoestrato de la línea celular PK15 y dejar dos pozos por cada placa como control celular.
- 9.- Al término del periodo de incubación lavar todos los pozos dos veces con SAF.
- 10.- Inocular 0.1 ml de la suspensión de glóbulos rojos de ave y cuye al 0.1 % a cada una de las microplacas (4 pozos con GR de cuye y 4 con GR de ave), considerando los controles negativos (2 pozos con GR de cuye y 2 con GR de ave).
- 11.- Una microplaca se incuba a 37°C por 30 minutos y la otra a 4° C por 1 hora.
- 12.- Después de la incubación observar cada uno de los pozos de las microplacas en un microscopio de luz invertida, para evidenciar hemoadsorción.

La prueba se considera satisfactoria cuando no se observe ECP ni hemoadsorción en ninguno de los pozos (9CFR 2006; OIE 2004).

5.1.3 PRUEBA DE HEMOAGLUTINACIÓN (HA).

El objetivo principal de esta prueba es demostrar que las vacunas utilizadas en la prevención de la EA están libres de virus contaminantes hemoaglutinantes, esta prueba aplica a los lotes de vacuna producidos en México o importados.

Equipo e instrumentos utilizados

- Lector de microplacas para HA.
- Refrigerador o cuarto frío a 4°C.
- Ultra congelador -80°C.
- Centrífuga clínica.
- Micropipetas de 50-300 microlitros.

Materiales

- Puntas para micropipeta.
- Microplaca de 96 pozos fondo en U.

Reactivos

- SAF Ph 7.0-7.2.
- Solución Alsevers.
- Suspensión de GR de ave o de cuye del 0.5-0.8%.
- Virus de referencia de Rubulavirus porcino.

Preparación y acondicionamiento de la muestra

Si la muestra se obtiene recientemente se debe centrifugar a 2000 rpm durante 10 minutos y se procede a analizarla.

Si no se trabaja de manera inmediata se almacena a -80°C.

- 1.- Depositar 30 microlitros de SAF en una microplaca de 96 pozos fondo U.
- 2.- Agregar 30 microlitros de fluido viral cosechado (2 pozos por fluido).
- 3.- Colocar en dos pozos virus de referencia de Rubulavirus porcino.
- 4.- Agregar 30 microlitros de suspensión de GR de ave o de cuye a todos los pozos dejando una hilera como control de GR.
- 5.- Homogenizar suavemente durante un minuto.

- 6.- Incubar la microplaca a temperatura ambiente 30-45 minutos aproximadamente.
- 7.- Transcurrido este tiempo se verifica que en la hilera del control de GR se observe botón y se realiza la lectura en un lector de microplacas para evidenciar la hemoaglutinación.

La prueba se considera satisfactoria cuando en ninguno de los fluidos de la vacuna se observe hemoaglutinación.

En el control de virus se observe hemoaglutinación.

En el control de GR se observe botón. (NOM-048-ZOO-1996; OIE 2004).

5.1.4 PRUEBA DE ELISA anti gB PRV/ADV.

El objetivo principal de esta prueba es confirmar que las vacunas contra la EA inducen la producción de anticuerpos séricos, esta prueba aplica a los lotes de vacuna contra la EA producidos en México o importados.

Equipo e instrumentos utilizados

- Pipetas de precisión para dispensar 50 a 300 microlitros.
- Lector para placas de 96 pozos.
- Bomba de vacío.
- Refrigerador a 4°C.
- Impresora.

Materiales

- Puntas desechables para pipeta.
- Probetas graduadas para la solución de lavado.
- Tubos de vidrio para diluir las muestras.
- Dispositivo para la dispensación y la aspiración de la solución de lavado.
- Gradilla.
- Vórtex.
- Frasco de vidrio o plástico.

Reactivos

- Agua destilada o desionizada.
- Sustrato (TMB).
- Solución detenedora de reacción.
- Diluyente de la muestra con tampón fosfato, estabilizantes protéicos y azida de sodio.
- Solución de lavado concentrada (10X) con tampón fosfato y gentamicina.
- Placa tapizada con antígeno.
- Anti-PRV gB: HRPO (Conjugado).
- Sueros problema.

- Suero control negativo con tampón fosfato, estabilizantes protéicos y azida de sodio.
- Suero control positivo de PRV Anti- PRV porcino en tampón fosfato con estabilizantes protéicos y azida de sodio.

Preparación y acondicionamiento de la muestra

Diluir los sueros a analizar, control positivo y negativo a una proporción de 1:2.

Si los sueros están congelados deben descongelarse para trabajarse.

La solución concentrada de lavado debe alcanzar temperatura ambiente y ser diluida 1:10 con agua destilada o desionizada.

Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente antes de usarse (18 a 25°C) y deben agitarse suavemente con movimiento circular o en un vórtex.

- 1.- Obtenga la placa (o placas) tapizadas con antígeno y anote la posición de la muestra en una hoja de trabajo.
- 2.- Depositar 100 microlitros del control negativo (diluido 1:2) en los pozos A1 y B1.
- 3.- Depositar 100 microlitros del control positivo (diluido 1:2) en los pozos C1 y D1.
- 4.- Depositar 100 microlitros de la muestra diluida en los pozos correspondientes.
- 5.- Todas las muestras de suero analizadas se incuban por una hora a temperatura ambiente.
- 6.- Lave cada pozo de tres a cinco veces con 300 microlitros con solución de lavado. aspire el líquido de todos los pozos después de cada lavado. Evite que las placas se sequen entre los lavados y antes de añadir el conjugado. Después de aspirar el líquido golpee la placa suave pero firmemente para eliminar el exceso de humedad.
- 7.- Depositar 100 microlitros de conjugado anti-PRV gB:HRPO en cada pozo.
- 8.- Incube 20 minutos a temperatura ambiente.
- 9.- Repita el paso 6.
- 10.- Depositar 100 microlitros de la solución de sustrato TMB en cada pozo de la placa.
- 11.- Incube 15 minutos a temperatura ambiente.
- 12.- Depositar 50 microlitros de solución detenedora en cada pozo para frenar la reacción.
- 13.- Obtenga el blanco en el espectrofotómetro con aire.
- 14.- Mida y anote los valores A (650) para las muestras y los controles.

Para que el ensayo sea válido la diferencia (N-P) entre el promedio del control negativo (PCN) y el promedio del control positivo (PCP) debe ser mayor o igual que 0.30. Si el ensayo no es válido, debe sospecharse que hubo un error en la técnica y el análisis debe repetirse después de leer el folleto de instrucciones minuciosamente.

La presencia o ausencia de anticuerpos frente al PRV se determina al calcular el cociente de muestra con respecto al control negativo (M/N) para cada muestra.

- 1.- Si el cociente M/N es menor o igual que 0.60 la muestra se clasifica como POSITIVA a los anticuerpos frente a ADV/PRV.
- 2.- Si el cociente M/N es menor o igual que 0.70 pero mayor que 0.60 la muestra deberá volver a ser analizada. Si el resultado se repite se deberá volver a obtener sangre de el animal y analizarla de nuevo.
- 3.- Si el cociente M/N es mayor que 0.70 la muestra se clasifica como NEGATIVA a los anticuerpos frente a ADV/ PRV.

CÁLCULOS:

- 1.- Cálculos de la media del control negativo (PCN).

$$PCN = \frac{A1 A (650) + B1 A (650)}{2}$$

- 2.- Cálculo de la media del control positivo (PCP).

$$PCP = \frac{C1 A (650) + D1 A (650)}{2}$$

- 3.- Cálculo de la muestra / negativo (M/N).

$$MN = \frac{\text{muestra A (650)}}{PCN}$$

(Laboratorio IDEXX)

La prueba de se considera satisfactoria cuando en los cerdos empleados para la prueba de potencia y seguridad se detecten anticuerpos séricos contra el VEA, mientras que en los cerdos empleados como controles y los de la prueba de cohabitación deben permanecer negativos.

Los sueros positivos y de cohabitación deben someterse a la prueba de ELISA gp1 (NOM-048-ZOO-1996).

5.1.5 PRUEBA DE ELISA gp1.

El objetivo principal de esta prueba es confirmar que las vacunas no estimulan la producción de anticuerpos séricos contra la gp1 de la EA, esta prueba aplica a los lotes de vacuna contra la EA producidos en México o importados.

Equipo e instrumentos utilizados

- Pipetas de precisión para colocar 50 a 300 microlitros.
- Lector para placas de 96 pozos.
- Bomba de vacío.
- Refrigerador a 4°C.
- Impresora.

Materiales

- Puntas desechables para pipetas.
- Probetas graduadas para la solución de lavado.
- Tubos de vidrio para diluir las muestras.
- Dispositivo para verter la solución de lavado.
- Gradilla.
- Vórtex.
- Frasco de vidrio o plástico.

Reactivos

- Agua destilada o desionizada.
- Sustrato (TMB).
- Solución inactivadora de reacción.
- Diluyente para muestra. Buffer con estabilizantes protéicos y azida de sodio.
- Placas adsorbidas con ADV.
- Anti-ADV gp1: peroxidasa de rábano macho (HRPO) en buffer con estabilizantes protéicos y gentamicina.
- Sueros problema.
- Suero control negativo.
- Suero control positivo ADV gp1.

Preparación y acondicionamiento de la muestra

Diluir los sueros a analizar, control positivo y negativo a una proporción de 1:2.

Si los sueros están congelados deben descongelarse para trabajarse.

La solución concentrada de lavado debe alcanzar temperatura ambiente y ser diluida 1:10 con agua destilada o desionizada.

Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente antes de usarse (18 a 23°C) y deben agitarse suavemente con movimiento circular o en un vórtex.

- 1.- Obtenga la placa (o placas) tapizadas con antígeno y anote la posición de la muestra en una hoja de trabajo.
- 2.- Depositar 100 microlitros del control negativo (diluido 1:2) en los pozos A1 y A2.
- 3.- Depositar 100 microlitros del control positivo (diluido 1:2) en los pozos A3 y A4.
- 4.- Depositar 100 microlitros de la muestra diluido en los pozos correspondientes.
- 5.- Todas las muestras de suero analizadas se incuban por una hora a temperatura ambiente (18-23°C).
- 6.- Lave cada pozo de tres a cinco veces con 300 microlitros con solución de lavado. aspire el líquido de todos los pozos después de cada lavado. Evite que las placas se sequen entre los lavados y antes de añadir el conjugado. Después de aspirar el líquido golpee la placa suave pero firmemente, para eliminar el exceso de humedad.
- 7.- Depositar 100 microlitros de conjugado anti-ADV gp1: HRPO en cada pozo.
- 8.- Incube 20 minutos a temperatura ambiente (18-23°C).
- 9.- Repita el paso 6.
- 10.- Depositar 100 microlitros de la solución de sustrato TMB en cada pozo de la placa.
- 11.- Incube 15 minutos a temperatura ambiente (18-23° C).
- 12.- Dispense 50 microlitros de solución de interrupción en cada pozo para frenar la reacción.
- 13.- Obtenga el blanco en el espectrofotómetro con aire.
- 14.- Mida y anote los valores A (650) para las muestras y los controles.
- 15.- Calcular los resultados.

Para que el ensayo sea válido, la media A (650) del control negativo, menos la media A (650) del control positivo debe ser mayor o igual a 0.30.

En ensayos no válidos, se debe de sospechar de la técnica y el análisis debe repetirse siguiendo una revisión minuciosa de las instrucciones del producto.

La presencia o ausencia de anticuerpos frente al antígeno gp1 se determina calculando el valor de inhibición de cada muestra.

- 1.- Si la inhibición es mayor o igual al 40% la muestra se clasifica como POSITIVA de anticuerpos frente al antígeno gp1 de ADV.
- 2.- Si la inhibición es mayor o igual al 30% pero menor que el 40% la muestra se clasifica como SOSPECHOSA de anticuerpos frente al antígeno gp1 de ADV y debe repetirse en una prueba posterior.
- 3.- Si la inhibición es menor que el 30% la muestra se clasifica como NEGATIVA de anticuerpos frente al antígeno gp1 de ADV.

CÁLCULOS:

- 1.- Cálculo de la media de control negativo (PCN).

$$\frac{A1 A (650) + A2 A (650)}{2}$$

- 2.- Cálculo de la media control positivo (PCP).

$$\frac{A3 A (650) + A4 (650)}{2}$$

- 3.- Cálculo de inhibición %:

$$\frac{\text{PCN} - \text{muestra A (650)}}{\text{PCN}} \times 100$$

(Laboratorio IDEXX)

La prueba se considera satisfactoria cuando los resultados de los sueros de potencia, seguridad y cohabitación resulten negativos a anticuerpos contra la gp1 (NOM-048-ZOO-1996).

5.1.6 PRUEBA DE SERONEUTRALIZACIÓN.

El objetivo principal de esta prueba es cuantificar los anticuerpos séricos contra el virus de la Enfermedad de Aujeszky en muestra de suero sanguíneo de porcinos, esta prueba aplica a los lotes de vacuna producidos en México o importados.

Equipo e instrumentos utilizados

- Agitador de microplacas.
- Baño María.
- Centrífuga clínica.
- Estufa de CO₂.
- Microscopio de luz invertida.
- Multipipetas de 8-12 canales (50-200 microlitros).
- Micropipetas unicanal (50-100 microlitros).
- Ultracongelador -80°C o termo con nitrógeno líquido.
- Refrigerador 4°C con congelador integrado.

Materiales

- Gradillas.
- Microplaca 96 pozos fondo plano.
- Puntas para pipetas.
- Tubos de ensayo.

Reactivos

- Antibiótico (penicilina, estreptomycin o kanamicina al 1%).
- Bicarbonato de sodio en solución al 7%.
- LE (Sales de Earles con lactoalbumina).
- Células PK15 (riñón de cerdo), SKL (línea de riñón de cerdo) o cualquier otra línea o cultivo al cual este adaptado el virus. Células en suspensión.
- Suero fetal bovino o suero de cabra libre de anticuerpos contra el VEA.
- Suero de porcino testigo negativo.
- Suero de porcino testigo positivo.
- Virus de la Enfermedad de Aujeszky con título mínimo de 10⁵ DIC₅₀ el cual se debe conservar en congelación a -70°C o en nitrógeno líquido.

Preparación y acondicionamiento de la muestra

Centrifugar la muestra de suero a 1500 rpm., transferir el suero a un tubo de ensaye e identificar, inactivar a 56°C durante 30 minutos en Baño María. En caso de que la prueba se lleve a cabo en fecha indeterminada la muestra preparada debe conservarse en congelación -20°C.

1.- En los dos primeros pozos de cada columna de una microplaca, depositar 50 microlitos del suero problema.

2.- Agregar a todos los pozos de la microplaca 50 microlitros de medio de diluyente (LE + 1% de bicarbonato de sodio).

3.- Hacer diluciones dobles a partir del segundo pozo, quedando el primer pozo como control de suero para detectar si este presenta toxicidad o alguna otra característica que puede interferir con la prueba.

4.- Agregar 50 microlitros de virus de la EA que contenga de 50-300 DICCC50% a cada pozo excepto a los controles de suero y control celular.

5.- Incubar durante 1 hr 37°C.

6.- Añadir 100 microlitros de células PK15 o equivalente e incubar de 48-72hrs, revisando diariamente los controles.

7.- Para el control de los biológicos utilizados, preparar en forma paralela otra microplaca con lo siguiente:

- Virus origen o de trabajo, a partir del cual se harán tres diluciones logarítmicas. Las que irán en las hileras correspondientes a:

- Control de células: depositar en las hileras 11 y 12 de la microplaca 100 microlitros de células PK15 o equivalente por pozo, para detectar posibles alteraciones en las mismas.

- Control de virus: el virus se ajusta de acuerdo al título 50 a 300 DICCC 50 %, a partir de lo cual efectuar tres diluciones logarítmicas para asegurar que hay 50 a 300 dosis.

1 y 2: virus de origen

3 y 4: 10⁻¹

5 y 6: 10⁻²

7 y 8. 10⁻³

- Control positivo: Utilizar un suero positivo con título conocido de anticuerpos contra EA. Colocar en la hilera número 9 de la microplaca.
- Control negativo: Emplear un suero testigo negativo a anticuerpos contra la EA y depositarlo en la hilera número 10 de la microplaca.

- 1.- Control de células: observar que el monoestrato esté completo y que las células presenten una morfología característica.
- 2.- Suero control positivo: observar que el monoestrato celular se encuentre completo en virtud de que el suero neutralizó al virus y evitó el efecto citopático.
- 3.- Suero control negativo: observar el efecto citopático producido por el virus, al no existir anticuerpos en el suero.

Los resultados de esta prueba se expresan en forma cuantitativa, con base en el título o cantidad de anticuerpos neutralizantes que estén presentes en el suero problema.

Por lo tanto los títulos serán cuantificados a partir del primer pozo en el que se observe claramente efecto citopático.

Es decir si el efecto citopático se observó en el pozo con dilución de 1:32, el título es expresado como 1:16 ya que en la siguiente dilución no se neutralizó el virus, por lo que este último provocó muerte celular (NOM-056-ZOO-1995).

Para poder iniciar las pruebas de seguridad, potencia y cohabitación todos los sueros deben resultar negativos a anticuerpos contra el virus de la EA de lo contrario las pruebas no deben realizarse.

5.1.7 PRUEBA DE TITULACIÓN.

El objetivo principal de esta prueba es confirmar que las vacunas contra la EA reúnen los requisitos de titulación para inducir una respuesta inmune adecuada, esta prueba aplica a los lotes de vacuna producidos en México o importados.

Equipo e instrumentos utilizados

- Refrigerador 4°C con congelador integrado.
- Estufa bacteriológica.
- Mechero de Bunsen o campana de flujo laminar.
- Microscopio de luz invertida.

Materiales

- Tubos de vidrio para diluir la muestra.
- Gradilla.
- Vórtex.
- Microplaca estéril de 96 pozos / cultivo celular.
- Pipetas serológicas de 1.0mililitros.
- Pipetas serológicas de 5.0mililitros.
- Pipetas serológicas de 10.0mililitros.
- Jeringa 10.0 mililitros desechable.
- Torundas de algodón.
- Gorros y cubrebocas.

Reactivos

- Alcohol al 70%.
- Bicarbonato de sodio (NaHCO₃ al 3%).
- L-glutamina.
- Medio esencial mínimo (MEM) para cultivo de tejidos.
- Solución amortiguadora de fosfatos (SAF) pH 7.0-7.2.
- Solución de antibióticos: penicilina, estreptomina y anfotericina.
- Línea celular estable PK15 en monoestrato de bajo pasaje.
- Vacuna contra la EA.

Preparación y acondicionamiento de la muestra

Reconstituir la vacuna en condiciones estériles.

- 1.- Retirar el medio de la microplaca.
- 2.- Realizar diluciones logarítmicas base 10 con MEM y NaHCO₃ al 3% (de -1 a -6).
- 3.- Inocular 8 pozos por dilución con 0.1ml de vacuna (de -2 a -6).
- 4.- Dejar 8 pozos como control celular.
- 5.- Incubar en cámara húmeda a 37°C durante seis días.
- 6.- Realizar la lectura de la microplaca en un microscopio de luz invertida para evidenciar ECP producido por el VEA.

La lectura se realiza de acuerdo al método de Spearman Kärber.

$$ID_{50} = X + \frac{1}{2} d - \frac{d}{n} \sum r_1$$

Donde:

X= la dilución mas alta de la prueba

d = Factor de dilución

\sum r1= numero total de no infectados

n = valor 0.5 (constante).

(Fuente: Fehervari 1998)

El resultado se considera satisfactorio cuando la vacuna tenga un título mínimo de 10⁵ DICC 50%/ dosis (NOM-063-ZOO-1999; NOM-048-ZOO-1996).

PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS PARA LA CONSTATACIÓN DE VACUNAS VIVAS CONTRA LA ENFERMEDAD DE AUJESZKY

5.2 PRUEBAS IN VIVO

5.2.1 PRUEBA DE POTENCIA.

El objetivo principal de esta prueba es demostrar que las vacunas contra la EA son capaces de proteger a los cerdos contra la infección de un virus virulento de la EA, esta prueba aplica a los lotes de vacuna producidos en México o importados.

Equipo e instrumentos utilizados

- Engargoladora.

Materiales

- Caja térmica para conservación de biológicos.
- Jeringas desechables de 5, 10 ,20 ml, con aguja del # 21 x 32.
- Marcador indeleble.
- Sistema de identificación de cerdos.
- Termómetros clínicos.
- Torundas de algodón.
- Frasco de vidrio con capacidad de 300 ml.
- Retapas de aluminio.
- Tapones para frasco de vacuna.

Reactivos

- Alcohol etílico al 70%.
- Vacuna contra la EA.
- Virus de desafío de la EA 10^5 DICC 50% / ml.

Animales

15 cerdos clínicamente sanos de 8 a 10 Kg de peso y 5 semanas de edad aproximadamente, negativos a anticuerpos contra el virus de la EA, determinados por la prueba de seroneutralización.

Condiciones ambientales

- Agua limpia y fresca.
- Alimentación de acuerdo a la etapa.
- Área de alta bioseguridad.
- Corraletas limpias, previamente desinfectadas, aisladas de las demás áreas de laboratorio y/o granja.
- Espacio vital mínimo de 0.33 m² por animal.
- Ventilación adecuada.

Preparación y acondicionamiento de la muestra

Reconstituir dos viales de vacuna por lote, mezclar en un frasco de vidrio y aplicar por la vía y dosis recomendada por el laboratorio productor.

- 1.- Inocular 10 cerdos por lote de vacuna por la vía y dosis recomendada por el laboratorio productor o por la norma aplicable.
- 2.- 5 cerdos deben mantenerse como testigos.
- 3.- Registrar las temperaturas rectales diariamente durante 21 días.
- 4.- Llevar a cabo inspección clínica de todos los animales.

Desafío:

El día 21 se obtiene una muestra sanguínea de ambos grupos y se les realiza prueba de ELISA monitoreo y gp1-, posteriormente son trasladados a las unidades de desafío, donde son desafiados con un virus patógeno de la EA cepa Becker que contenga no menos de 10⁵ DICCC 50% / ml por vía intranasal con 2 ml cada uno (1ml por fosa).

Observaciones post-desafío:

Registrar la temperatura rectal y los signos clínicos de todos los animales diariamente durante 14 días.

Los cerdos que enfermen y/o mueran con signos clínicos de la enfermedad son enviados al área de patología para realizar el diagnóstico de laboratorio de la EA.

Al término de la prueba todos los animales son sacrificados por el método de electroinsensibilización y eliminados por incineración (NOM-033-ZOO-1993).

La prueba se considera satisfactoria cuando por lo menos el 80% de los cerdos testigos presenten signos nerviosos y/o respiratorios como se describe en la NOM- 007-ZOO-1994 o muerte por la EA y por lo menos el 80% de los cerdos vacunados permanezcan vivos sin signos clínicos de la EA al ser observados durante 14 días post- desafío (NOM-048-ZOO-1996; OIE 2004).

5.2.2 PRUEBA DE SEGURIDAD.

El objetivo principal de esta prueba es demostrar que las vacunas utilizadas en la prevención de la EA son inocuas y seguras para los cerdos, esta prueba aplica a los lotes de vacuna producidos en México o importados.

Equipo e instrumentos utilizados

- Engargoladora.

Materiales

- Caja térmica para conservación de biológicos.
- Jeringas desechables de 5, 10 ,20 ml, con aguja del # 21 x 32.
- Marcador indeleble.
- Sistema de identificación de cerdos.
- Termómetros clínicos.
- Torundas de algodón.
- Frasco de vidrio con capacidad de 300 ml.
- Retapas de aluminio.
- Tapones para frasco de vacuna.

Reactivos

- Alcohol etílico al 70%.
- Vacuna contra la EA.

Animales

2 cerdos clínicamente sanos de 8 a 10 Kg de peso y 5 semanas de edad aproximadamente, negativos a anticuerpos contra virus de la EA determinados por la prueba de seroneutralización.

Condiciones ambientales

- Agua limpia y fresca.
- Alimentación de acuerdo a la etapa.
- Área de alta bioseguridad.
- Corraletas limpias, previamente desinfectadas, aisladas de las demás áreas de laboratorio y/o granja.
- Espacio vital mínimo de 0.33 m² por animal.
- Ventilación adecuada.

Preparación y acondicionamiento de la muestra

Reconstituir dos viales de vacuna por lote, mezclar en un frasco de vidrio y aplicar por la vía y dosis recomendada por el laboratorio productor.

- 1.- Inocular por vía intramuscular profunda (tabla del cuello) 5 dosis en cada lado a cada uno de los cerdos.
- 2.- Observar los cerdos diariamente durante 21 días para descartar alguna reacción adversa al producto.
- 3.- Registrar la temperatura rectal de cada uno durante el periodo de observación.
- 4.- Llevar a cabo la inspección clínica de todos los animales.
- 5.- A los 21 días post vacunación obtener muestra sanguínea para la realización de pruebas de ELISA monitoreo y gp1.

Al término de la prueba todos los animales son sacrificados por el método de electroinsensibilización y eliminados por incineración (NOM-033-ZOO-1993).

El lote de vacuna se considera satisfactorio cuando los cerdos no presenten signos nerviosos atribuibles a la vacuna. En caso de observarse signos clínicos de enfermedad no atribuibles a la vacuna la prueba debe repetirse (OIE 2004; NOM-048-ZOO-1996).

5.2.3 PRUEBA DE COHABITACIÓN.

El objetivo principal de esta prueba es demostrar que el virus vacunal de la EA no es excretado por los cerdos vacunados y no es transmitido a los cerdos no vacunados, esta prueba aplica a los lotes de vacuna producidos en México o importados.

Materiales

No aplica.

Animales

Por cada lote de vacuna 2 cerdos que son los utilizados en la prueba de seguridad de 8 a 10 Kg y 5 semanas de edad negativos a anticuerpos contra virus contra la EA, determinados por la prueba de seroneutralización.

Por cada lote de vacuna 2 cerdos clínicamente sanos de 8 a 10 Kg y 5 semanas de edad negativos a anticuerpos contra virus de la EA, determinados por la prueba de seroneutralización.

Condiciones ambientales

- Agua limpia y fresca.
- Alimentación de acuerdo a la etapa.
- Área de alta bioseguridad.
- Corraletas limpias, previamente desinfectadas, aisladas de las demás áreas de laboratorio y/o granja.
- Espacio vital mínimo de 0.33 m² por animal.
- Ventilación adecuada.

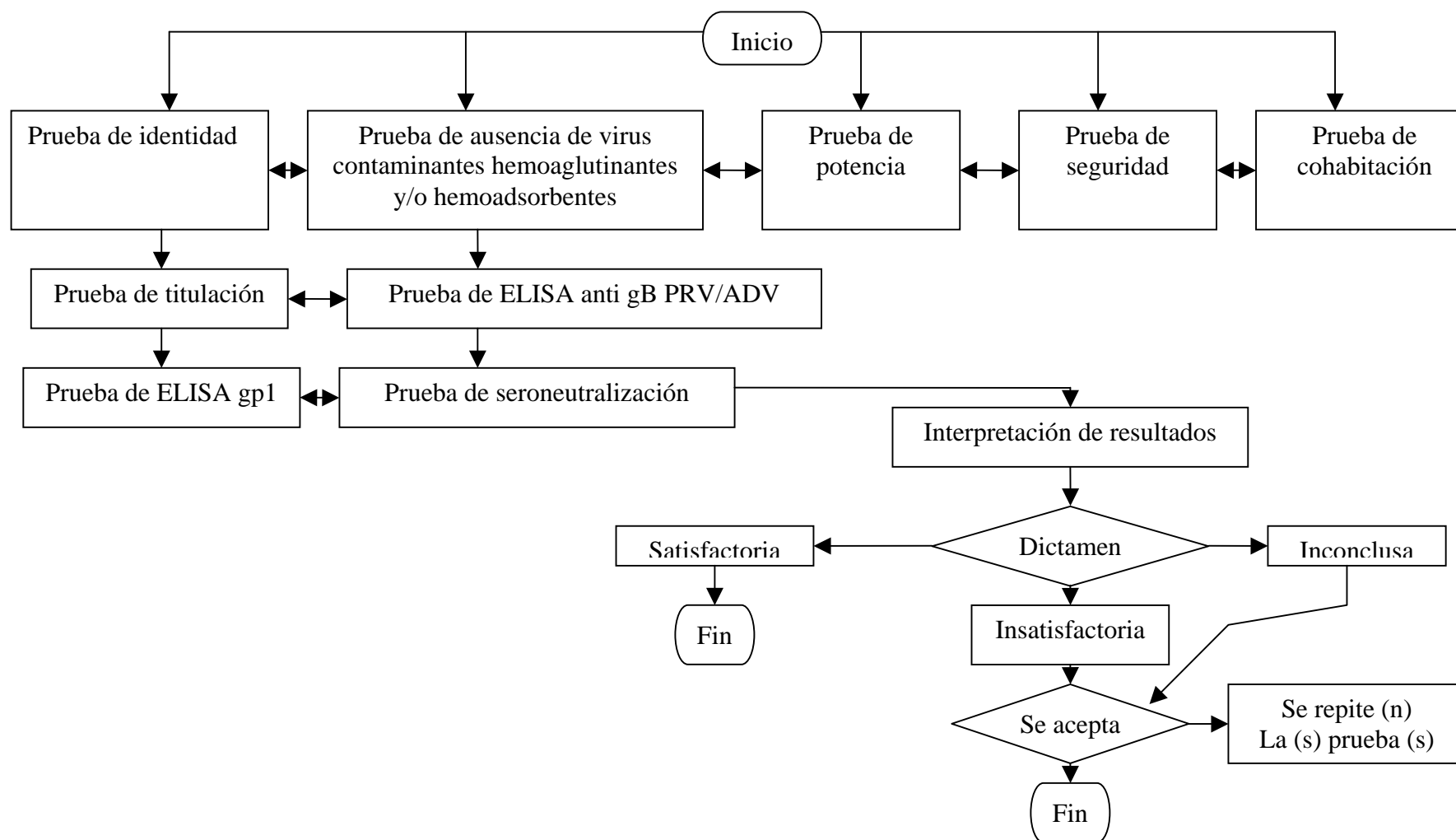
- 1.- Los dos cerdos de cohabitación libres de anticuerpos se alojan con los dos cerdos que se utilizan en la prueba de seguridad,
- 2.- Llevar a cabo la inspección clínica de todos los animales durante 21 días.
- 3.- Registrar la temperatura de los cuatro cerdos diariamente.
- 4.- A los 21 días de prueba se obtienen muestras de suero.
- 5.- Las muestras de suero sanguíneo de los cerdos de cohabitación se deben someter a las pruebas de ELISA monitoreo y gp1.

Al término de la prueba todos los animales son sacrificados por el método de electroinsensibilización y eliminados por incineración (NOM-033-ZOO-1993).

La prueba se considera satisfactoria cuando los cerdos no presenten signos clínicos de la EA y en las muestras de suero sanguíneo no se detecten anticuerpos contra la EA en ninguna de las pruebas de ELISA monitoreo y gp1 (OIE 2004).

NOTA: Al concluir las pruebas, los formatos utilizados para cada una se integran en un expediente con el número de caso respectivo, para así poder emitir el dictamen final que puede ser: **SATISFACTORIO, INSATISFACTORIO o INCONCLUSO** (ver diagrama 3).

DIAGRAMA 3. EMISIÓN DEL RESULTADO FINAL.



6. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN.

Las vacunas vivas contra la Enfermedad de Aujeszky no están contempladas en la normatividad mexicana vigente y son constatadas de acuerdo al Código Federal de Regulaciones (CFR) de los Estados Unidos de América (EUA), Manual de la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) y los protocolos de control de calidad de las empresas titulares del producto. Dichas vacunas están elaboradas a partir de Ingeniería Genética, tienen delección del Gen que codifica proteínas ligadas a la virulencia (timidin – kinasa) o proteínas que como la gP1 no son importantes en la inducción de una respuesta inmune y permite diferenciar las cepas vacunales y los anticuerpos de los producidos por cepas de campo (Boehringer 2001).

Las vacunas contra la enfermedad de Aujeszky constatadas en el CENASA han demostrado ser seguras e inocuas, al aplicar 10 dosis por cerdo sin mostrar reacción alguna, también han demostrado ser puras al contener solamente el virus de la Enfermedad de Aujeszky han demostrado un grado de protección mínima de un 80% en la prueba de potencia, esto confirma que el grado de inmunogenicidad de dichas vacunas es bueno, también permite diferenciar los anticuerpos de los producidos por cepas de campo, a través de la prueba de ELISA gP1 , además estas vacunas no diseminan ni transmiten el virus a otros cerdos en contacto, demostrado por la prueba de cohabitación (CENASA: 2007).

Para poder iniciar las pruebas de seguridad, potencia y cohabitación todos los sueros deben resultar negativos a anticuerpos contra el virus de la EA de lo contrario las pruebas no deben realizarse.

Existen diferentes marcas comerciales de kits de ELISA utilizados para la constatación de las vacunas contra la Enfermedad de Aujeszky; sin embargo nunca se ha realizado un estudio comparativo en cuanto a la sensibilidad y la especificidad de dichos estuches.

Por otra parte la cepa Becker utilizada para el desafío en la prueba de potencia resulta ser muy termosensible aún con estabilizador; se debe tener otra cepa alternativa, estandarizada, termoestable y de bajo pasaje.

7. RECOMENDACIONES.

Para el control y la erradicación de la enfermedad de Aujeszky no se debe de escatimar en recursos: materiales, humanos y financieros ya que se recomienda la constatación de todos y cada uno de los lotes de las vacunas contra la EA, producidos en México o importados, tomando en cuenta que existe una campaña para tal fin (NOM-048-ZOO-1996).

Solicitar la modificación a la NOM-048-ZOO-1996 en la cual se incluyan como anexos a los procedimientos técnicos anteriormente descritos.

Elaborar procedimientos técnicos para la constatación de vacunas inactivadas contra la EA y anexarlos a la NOM-048-ZOO-1996.

En la actualidad todavía se depende del extranjero para cubrir las necesidades de reactivos biológicos, se recomienda crear un área exclusivamente para tal fin con personal altamente calificado para que elabore los reactivos biológicos necesarios para la constatación de las vacunas contra la EA.

Contar con equipo automatizado como software para realizar los cálculos de las densidades ópticas de las pruebas de ELISA.

Cursos de actualización y capacitación para la constatación de vacunas contra la EA.

8. CONCLUSIONES.

Estos procedimientos técnicos se elaboraron con base en el formato de la NOM-036-ZOO-1996 Requisitos mínimos para las vacunas contra la Fiebre Porcina Clásica.

La elaboración de estos procedimientos técnicos tiene como finalidad enriquecer y dar seguimiento a la normatividad vigente en cuanto a constatación de biológicos se refiere (NOM-048-ZOO-1996).

Estos procedimientos técnicos están elaborados con base en referencias bibliográficas tanto nacionales como estándares a nivel internacional, las cuales nos han aportado información muy valiosa para la culminación de dicho trabajo.

Estos procedimientos han servido de soporte técnico para realizar la constatación de las vacunas contra la EA en México. Además con éstos procedimientos se ha comprobado que realmente las vacunas son puras, seguras e inocuas y altamente inmunogénicas. También podemos concluir que las técnicas utilizadas en la constatación de las vacunas contra la EA son adecuadas; por lo anteriormente descrito se sugiere que estos procedimientos técnicos se anexasen en apéndices normativos a la NOM-0048-ZOO-1996. Requisitos mínimos para las vacunas contra la Enfermedad de Aujeszky.

9. BIBLIOGRAFÍA.

1. “Acuerdo de colaboración intersecretarial SARH-SSA” Junio de 1993.
2. Arias M., Sierra M.A., Sánchez-Vizcaíno JM. “Curso Digital de Enfermedades Infecciosas Porcinas”. www.sanidadanimal.info/cursos/curso/2/2-ajeszky.htm. 2008.
3. Boehringer Ingelheim Laboratorios. “El virus, la enfermedad, la inmunidad, el diagnóstico y la vacunación”.
www.boehringer-ingelheim.es/veterinaria/ajeszky.2001.
4. British Pharmacopoeia, “Incorporating the Requirements of the 4th”. Edition 2004.
5. “CENASA 25º aniversario1974-1999.” Edición 1999.
6. “Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal 2007”.
7. “Code Federal of Regulations.” Animals and Animal Products parts 1 to 199 Archives and Records Administration. January 1, 2006.
8. Cubero M.J., León L.V., “Enfermedades infecciosas de los animales”. Murcia (España), 2004: 181-185.
9. Echeverría. “Actualización en Enfermedad de Aujeszky”.
www.fcv.unlp.edu.ar/analecta/vol2on2/046-VE2on2-echeverria-enfermedad-ajeszky.pdf. 2000.
10. “European Pharmacopoeia as Amended by Supplements” 4.1-4.8 inclusive version 8.0 2002.
11. Fehervari T. “A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens”. Budapest. Bimbo U.190 Hungary fourth edition, 1998.
12. Granillo B.N., “Monografía Municipal Tecámac”. México 5ª Edición 2006.
13. Hans P., Klaus B., “Manual de las enfermedades del cerdo”. España, Acibia. 2ª Edición 2001: 215-221.
14. “IDEXX Laboratories. Inc HerdChek. Kit para la detección de los anticuerpos Anti-gB del Virus de la Pseudorrabia Porcina o Enfermedad de Aujeszky” (PRV/ADV).
15. “IDEXX Laboratories. Inc HerdChek. Kit para la detección de los anticuerpos anti-gp1 del virus de la Enfermedad de Aujeszky” (ADV).
16. “ISO 9001:2000” Sistemas de Gestión de la Calidad. Requisitos.

17. Jasso B.C. "Evaluación, constatación y control de calidad de dos vacunas de virus vivo modificado contra la Enfermedad de Aujeszky". Tesis de Licenciatura. FES-Cuautitlán, 2005.
18. "Manual of Diagnostic and Vaccines for Terrestrial Animals". Office International des Epizooties. 5th edition 2004.
19. Morilla A.G., "Manual para el control de las Enfermedades Infecciosas de los cerdos". México 2^a Edición 2005: 141-156.
20. "NMX-EC-17025- IMNC-2006". Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.
21. "NOM-003-ZOO-1993". Criterios de operación de laboratorios de prueba aprobados en materia zoosanitaria Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación.
22. "NOM-007-ZOO-1994". Campaña Nacional Contra la Enfermedad de Aujeszky. Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación.
23. "NOM-012-ZOO-1993". Especificaciones para a la regulación de productos químicos, farmacéuticos, biológicos y alimenticios para uso en animales o consumo por éstos. Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación.
24. "NOM-022-ZOO-1995". Características y especificaciones zoosanitarias para las instalaciones, equipo y operación de establecimientos que comercialicen productos químicos, farmacéuticos, biológicos y alimenticios para uso en animales o consumo por éstos. Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación.
25. "NOM-026-ZOO-1994". Características y especificaciones zoosanitarias para las instalaciones, equipo y operación de establecimientos que fabriquen productos químicos, farmacéuticos y biológicos para uso en animales. Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación.
26. "NOM-029-ZOO-1995". Características y especificaciones para las instalaciones y equipo de los laboratorios de pruebas y/o análisis en materia zoosanitaria Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación.

27. “NOM-033-ZOO-1995”. Sacrificio Humanitario de los animales domésticos y silvestres. Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación.
28. “NOM-036-ZOO-1996”. Requisitos mínimos para las vacunas contra la fiebre porcina clásica. Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación.
29. “NOM-048-ZOO-1996”. Requisitos mínimos para las vacunas contra la enfermedad de Aujeszky. Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación.
30. “NOM-056-ZOO-1995”. Especificaciones técnicas para las pruebas diagnósticas que realicen los laboratorios de pruebas aprobados en materia zoosanitaria. Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación.
31. “NOM-063-ZOO-1999”. Especificaciones que deben cumplir los biológicos empleados en la prevención y control de las enfermedades que afectan a los animales domésticos. Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación.
32. “Porcicultura. Enfermedad de Aujeszky”.
www.porcicultura.com/szrm/?rm=eaft. 2008.
33. Ramírez R.N., Pijoan C.A. “Enfermedades de los cerdos”. Diana 1ª Edición 1987: 139-147.
34. Sánchez-Vizcaíno JM. “Curso de introducción a la inmunología porcina”.
www.sanidadanimal.info/cursos/inmuno2ca091.htm 2ª Edición 2004.