



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**“EVALUACIÓN, CONSTATAción Y CONTROL
DE CALIDAD DE DOS VACUNAS DE VIRUS
VIVO MODIFICADO CONTRA LA
ENFERMEDAD DE AUJESZKY”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

P R E S E N T A :

CAROLINA JASSO BASALDÚA

**ASESOR:
MC. HUMBERTO ALEJANDRO MARTÍNEZ RODRÍGUEZ.**

**COASESOR:
MVZ. JUAN ANTONIO MADRID DÍAZ.**

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2005

m 344 890



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS
U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES-CUAUTITLÁN



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
P R E S E N T E

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Evaluación, constatación y control de calidad de dos vacunas de
virus vivo modificado contra la Enfermedad de Aujeszky.

que presenta la pasante: Carolina Jasso Basaldúa
con número de cuenta: 9754311-2 para obtener el título de:
Médica Veterinaria Zootecnista

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 5 de octubre de 2004

PRESIDENTE	M.C. José Antonio Licea Vega	<u>José Antonio Licea Vega</u>
VOCAL	M.C. Alejandro Martínez Rodríguez	<u>Alejandro Martínez Rodríguez</u>
SECRETARIO	MVZ. Raúl García Tinajero	<u>Raúl García Tinajero</u>
PRIMER SUPLENTE	MVZ. Rodolfo Córdova Ponce	<u>Rodolfo Córdova Ponce</u>
SEGUNDO SUPLENTE	QFB. Alicia Alquicira Camacho	<u>Alicia Alquicira Camacho</u>

GRACIAS:

Este proyecto de tesis no hubiera sido posible sin la ayuda del *MVZ. Octavio Cruz Chávez*, quien además de brindarme su apoyo en la realización de éste trabajo, también me enseñó el valor de la honestidad, para él mi más grande reconocimiento.

A mi familia: mis padres, mis hermanos, mis amigos, por su comprensión, cariño, ejemplo y apoyo.

A la UNAM, en especial a la FESC-4, por ser el hogar de mi formación profesional y a todos y cada uno de los profesores que me brindaron su tiempo.

A mis asesores de Tesis por su apoyo en la realización de este trabajo.

Al CENASA y a todas las personas con las que tuve la oportunidad de colaborar.

*" Porque el corazón late
bajo una cubierta de pelo,
piel, plumas o alas,*

*¿es por esa razón
que no debe ser
tomado en cuenta?"*

JPR

CONTENIDO.

INDICE

“Evaluación, constatación y control de calidad de dos vacunas de virus vivo modificado contra la Enfermedad de Aujeszky”.

	Página
I. Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal	4
II. Resumen	6
III. Introducción	7
IV. Antecedentes de la enfermedad	
4.1. Definición	9
4.2. Historia	9
4.3. Distribución	9
4.4. Etiología	10
4.5. Patogenia	11
4.6. Cuadro clínico	13
4.6. Lesiones macroscópicas	15
4.8. Respuesta Inmune	16
4.9. Diagnóstico diferencial	16
4.10. Diagnóstico	
4.10.1. Diagnóstico clínico	17
4.10.2. Estudio histopatológico	17
4.10.3. Diagnóstico de laboratorio	18
4.11. Control y erradicación	21
4.12. Las vacunas con delección gE	23
4.13. Programas de vacunación	25

V. Objetivo general	28
VI. Objetivos particulares	29
VII. Justificación	30
VIII. Material y Método	
8.1. Pruebas realizadas a los lotes de vacuna de virus vivo modificado antes de salir al mercado.	31
8.2. Desarrollo del trabajo	32
IX. Resultados de las pruebas	
9.1. Pruebas <i>in vivo</i>	42
9.2. Pruebas fisicoquímicas	43
9.3. Pruebas <i>in vitro</i>	44
X. Discusión	49
XI. Conclusión	51
XII. Anexos	53
XIII. Referencias	62

I. CENTRO NACIONAL DE SERVICIOS DE DIAGNÓSTICO EN SALUD ANIMAL



En la actualidad la producción porcina nacional se estima en un valor de 90,000 millones de pesos. Además del potencial económico que se encierra en ese valor, está su importancia estratégica en la industria alimenticia de nuestro país. El Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), a través de la Dirección General de Salud Animal (DGSA), se encarga de normar, regular y vigilar el cumplimiento de las acciones encaminadas a promover la salud animal mediante las campañas zoonosanitarias, vigilancia epizootológica, control de movilización de animales y productos y subproductos, así como de los productos químicos, farmacéuticos, biológicos y alimenticios para uso y consumo por animales, 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 los mecanismos para constatar los resultados obtenidos como es el caso de los laboratorios de referencia. Para este fin, la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), cuenta con dos laboratorios especializados, que fungen de manera estratégica en el cumplimiento de la referencia en diagnóstico y constatación de productos biológicos veterinarios; estos son:

El Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal (CENASA), ubicado en Santa Ana Tecámac, Estado de México, y el Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal (CENAPA), ubicado en Jiutepec, Morelos. En dichas instituciones se realizan los análisis indispensables para que los monitoreos, con fines de diagnóstico o constatación, tengan la confiabilidad establecida por la Normatividad Mexicana e Internacional, entre otras funciones se encuentran:

- Establecer técnicas para la constatación y certificación de los productos biológicos en coordinación con el Departamento de Control y Regulación de Empresas y Productos.
- Efectuar las pruebas de laboratorio necesarias para certificar que las vacunas cumplen con los requisitos mínimos de calidad en cuanto a pureza, esterilidad, inocuidad, titulación, identidad y potencia.
- Evaluar la calidad de los reactivos de diagnóstico de enfermedades en cuanto a pureza, esterilidad, sensibilidad, etc.

ANTECEDENTES HISTÓRICOS DEL CENASA.

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 cuarentena para el ganado que iba a reponer a 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 y 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, DF. Dicho Laboratorio además de realizar el diagnóstico de las enfermedades de los animales domésticos, servía de apoyo a los laboratorios de la RENALDI, funcionando como referencia, ya que contaba con profesionales calificados realizando técnicas diagnósticas que los demás laboratorios no tenían instaladas y capacitando personal técnico de la DGSA.

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. 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 edificadas. 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 nivel de especialización de su personal así como por la diversidad y precisión en las pruebas que en él se realizan.

CONSTATAción Y CONTROL DE CALIDAD

En esta área se realizan pruebas con estricto cumplimiento de las Normas Oficiales Mexicanas (NOM). En caso de no existir un marco referencial para la realización de los análisis, se consulta el Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines de la Organización Mundial de la Salud Animal (OIE), el Código Federal de Regulaciones de los EUA (CFR), o se valida la técnica de análisis del laboratorio productor. Los análisis se aplican a vacunas activas e inactivadas, antígenos toxoides y kits de diagnóstico de enfermedades de aves, bovinos, cerdos, ovinos, caprinos y pequeñas especies. Los estudios que se realizan en este laboratorio se encuentran señalados en la NOM-012-ZOO-1993, Especificaciones para la regulación de productos químicos, farmacéuticos, biológicos y alimenticios para uso en animales o consumo por estos, y son los siguientes:

- ❖ Físicoquímicos: Vacío, determinación de pH, humedad, determinación de formol, determinación de fenol.
- ❖ Pruebas "in vitro": Pruebas de pureza, esterilidad, determinación de Micoplasmas, conteo viable, disociación, hemoaglutinación, inhibición de la hemoaglutinación, titulación, titulación en embrión de pollo, titulación en cultivos celulares, seroneutralización, ELISA, inhibición de focos fluorescentes.
- ❖ Pruebas "in vivo": Pruebas de seguridad, pruebas de potencia, pruebas de virus extraños, pruebas de cohabitación, pruebas de inactivación viral (CENASA, 1999).

II. RESUMEN.



En el presente trabajo se evaluó la capacidad de dos vacunas comerciales de virus vivo modificado con delección del gen gE contra la Enfermedad de Aujeszky, elaboradas por dos laboratorios distintos, demostrando que son efectivas al conferir inmunidad al 90% de los cerdos vacunados frente al desafío con una cepa patógena Becker, del mismo modo se pudo comprobar que es inocua ya que no se observaron efectos adversos atribuibles a la vacuna en los cerdos que fueron vacunados con 10 dosis del biológico y que es incapaz de infectar a animales sanos en convivencia con animales vacunados.

Las características de calidad requeridas para su empleo se comprobaron al realizar una serie de pruebas a nivel de laboratorio, con lo cual pudimos concluir que los biológicos están libres de agentes contaminantes bacterianos y virales, están elaborados a partir de una cepa estandarizada del virus de la EA, el contenido viral de las vacunas es suficiente para inducir inmunidad, las cepas empleadas cuentan con delección de la glicoproteína E y que cumplen con las pruebas de control fisicoquímico.

Es importante mencionar que este tipo de vacunas, al no estar contempladas dentro de las Normas Oficiales Mexicanas, fueron constatadas a partir de los protocolos de control de calidad de las empresas titulares del producto y de estándares establecidos por la Organización Mundial de la Salud Animal (OIE), antes denominada Oficina Internacional de Epizootias y el Código Federal de Regulaciones (CFR) de los EUA.

III. INTRODUCCIÓN.



La Enfermedad de Aujeszky (EA), también conocida como pseudorabia, es causada por un Alfaherpesvirus miembro de la familia Herpesviridae que infecta el sistema nervioso central y otros órganos, tal como el tracto respiratorio, virtualmente en todos los mamíferos a excepción de los humanos y los primates. Esta asociado primariamente a los cerdos, el huésped natural, que permanece infectado latentemente después de la recuperación clínica. La enfermedad se controla por contención de hato infectado y el uso de vacunas y la eliminación de los animales infectados de manera latente (OIE, 2004).

El control de las infecciones por el virus de la EA en cerdos puede ser llevada a cabo, iniciando al mismo tiempo la erradicación del agente infeccioso con ayuda de la vacunación. Por lo tanto, para que el programa de erradicación y vacunación sean compatibles es necesaria la capacidad para distinguir entre animales que han sido vacunados de los que han estado expuestos a las cepas de campo (Visser, 1989).

Para este fin, las cepas que no expresan una o diferentes glicoproteínas virales no esenciales han sido construidas para proveer los medios de distinción serológica entre animales vacunados y los expuestos al virus de campo. Debido a que las infecciones latentes son importantes en la perpetuación de la enfermedad, es esencial que la vacuna sea lo suficientemente potente no solo para prevenirla, sino también para prevenir el establecimiento de la latencia en animales vacunados que entran en contacto con cepas virulentas (Mengeling, 1992).

A partir de la década de los cuarentas comenzaron a utilizarse las primeras vacunas vivas frente a la Enfermedad de Aujeszky. A estas vacunas le siguieron otras que empleaban cepas atenuadas por pases en cultivos celulares. De ellas las más destacadas fueron las cepas Bartha k/61, Bucarest y sus derivadas NIA-4 y Alfort 26, así como mutantes inducidos químicamente: MK-25 y MK-35 (Arias, 2000).

A mediados de los años ochentas comienzan a utilizarse técnicas de ADN recombinante usando técnicas de ingeniería genética para conseguir nuevas cepas atenuadas mediante la inactivación, modificación y eliminación de genes implicados en la virulencia del virus, y de genes que codifican para algunas glicoproteínas estructurales y no estructurales del VEA, lo que ha conducido al desarrollo de las vacunas marcadas (Pensaert, 1990).

Se han utilizado una amplia gama de vacunas marcadas obtenidas por ingeniería genética, que no expresan algunas de las glicoproteínas del virus, gE, gG ó gC, las cuales actúan como marcadores en las infecciones de campo (Sánchez, 2002). En la actualidad las vacunas marcadas gE- son las que se han impuesto a nivel mundial, principalmente por sus características inmunológicas, por los niveles de sensibilidad y especificidad en las pruebas diferenciales de diagnóstico desarrollados, y por los éxitos conseguidos de su amplia utilización en campo (Arias, 2000).

Para el control y erradicación de la Enfermedad de Aujeszky se utilizan vacunas con delección genética (señaladas en la NOM-007-ZOO-1994, Campaña Nacional contra la Enfermedad de Aujeszky), que además de proveer inmunidad a los cerdos, permite la diferenciación entre los animales vacunados y los infectados con virus de campo.

Las vacunas de virus vivo atenuado o modificado genéticamente se están utilizando en la mayoría de los países, debido a que estimulan tanto la inmunidad de tipo humoral y como la de tipo celular; por este motivo cuando se utilizan en regiones donde hay prevalencia elevada, es posible eliminar la EA con mayor facilidad y rapidez que con las vacunas inactivadas (Campomanes, 2000).

En México aun no se tiene experiencia con el uso de vacunas vivas deletadas, solo han sido utilizadas vacunas inactivadas con delección gE-, por lo que el objetivo principal de este trabajo es evaluar la inmunogenicidad, contagiosidad y características de calidad de dos vacunas elaboradas con virus vivo modificado gE- de las cepas Bucarest y Begonia contra la Enfermedad de Aujeszky.

IV. ANTECEDENTES DE LA ENFERMEDAD DE AUJESZKY



4.1. Definición.

La Enfermedad de Aujeszky (EA) es también conocida como pseudorabia. Es una entidad nosológica, causada por un virus Herpes, que afecta en forma natural a los porcinos, bovinos, ovinos, caprinos, caninos y felinos, además de algunos animales silvestres. Esta enfermedad se caracteriza por afectar principalmente los sistemas nervioso, respiratorio y reproductor (Hans, 2000). Los cerdos que padecen la EA pueden presentar todos o algunos de los siguientes signos, dependiendo de la edad, fin zootécnico y la cepa viral causante de la infección (Fenner, 1987):

- ❖ Pelo hirsuto, fiebre, anorexia, temblor muscular, ataxia, postración, movimientos de carrera, nistagmus, opistótonos, tortícolis y muerte.
- ❖ Tos, estornudos, fiebre, anorexia, postración y muerte.
- ❖ Disminución de la fertilidad, abortos, momificación fetal, mortinatos y/o repetición de calores.

4.2. Historia.

La Enfermedad de Aujeszky fue observada por primera vez por Aujeszky en Hungría en 1902, quien la consideró enfermedad independiente y la separó exactamente de la rabia. En 1938 Galloway señala su difusión por casi todos los países europeos, Norteamérica, así como por algunos países de Sudamérica, el norte de África y Asia. Sabin reportó que el virus fue relacionado con el *virus herpes simplex* y el VEA fue clasificado en el grupo de los Herpesvirus. Entre la década de los 40's y los 50's cultivos celulares de ratón fueron usados para replicar el virus. El aislamiento viral, ahora es realizado de manera rutinaria en cultivos celulares sensibles de conejo y propagado en una gran variedad de líneas celulares (Edwards, 1990).

La pseudorabia de los cerdos fue descrita en 1920 y la primera enzootia en cerdos apareció en 1931. En los años siguientes brotes esporádicos ocurrieron en diferentes lugares de Europa, los Estados Unidos, África del Norte y Turquía. En áreas donde las granjas de cerdos predominaban, repentinamente aparecía el VEA y comprometió a la mayoría de los cerdos susceptibles. El patrón epidemiológico cambió entre la década de los cincuenta y sesenta debido a la formación de las grandes unidades porcinas. El VEA se vuelve enzootico en granjas engordadoras y de cría en el este y sureste de Europa y en el oeste de los Estados Unidos. A mediados de los 70's, el VEA se disemina a Europa central y sureste de Asia y adquiere gran importancia económica mundial (Hans, 2000).

4.3. Distribución.

En la actualidad, la Enfermedad de Aujeszky está ampliamente distribuida a escala mundial y es de declaración obligatoria en varios países. En algunos se llevan a cabo campañas de erradicación, unas basadas en el sacrificio y otras en el uso de vacunas (Boehringer, 2002).

La incidencia del VEA es alta en Europa, en las áreas con climas fríos y engordas intensivas, tal como en Holanda, Bélgica, Francia y Hungría, y esta considerado en menor grado en lugares con baja producción intensiva (Granoff, 1999).

4.4. Etiología.

El virus de la Enfermedad de Aujeszky pertenece al grupo de los virus Herpes (herpes virus porcino 1, HVP1). El VEA consta de un virión que mide de 150 a 200 nm de diámetro y una doble cadena lineal de ADN con cerca de 80 genes, esta molécula esta formada por dos componentes, L y S. El componente S consiste en una secuencia única corta (U_s) y en una secuencia única larga (U_L). En la región U_s se codifican los genes para las glicoproteínas gX, gp50, gp63 y gpl (gE), mientras que la región U_L se codifican los genes para las glicoproteínas gII, gIII y gH. Su ADN, situado en la parte central, esta rodeado en primer lugar por una cápside icosaédrica, y más exteriormente por un tegumento amorfo que contiene proteínas de origen vírico, todo ello envuelto por una cubierta de glicoproteínas (Gp) rica en lípidos, derivada del aparato de Golgi (Mohanty, 1998; Edwards, 1990).

Glicoproteínas.

En la envoltura vírica están presentes las glicoproteínas (gp), que son los principales componentes estructurales reconocidos por el sistema inmune, son mediadores importantes en la integración entre el virus y la célula diana durante la infección vírica (Boehringer, 2000). Las glicoproteínas de la envoltura vírica se clasifican como esenciales o no esenciales (tabla 1. Anexo: página 51) según los requerimientos del virus para poder replicarse en cultivos celulares (Zuckermann, 1989).

Gen TK.

Se encuentra en el genoma de algunos HV, es no esencial para el crecimiento en cultivos celulares activos (mitosis). El gen TK sintetizado por los alfa-herpesvirus facilita la replicación en células que no se dividen. Algunas investigaciones recientes demostraron que los HV tipo 1 TK muestran baja patogenicidad para su huésped natural y son menos reactivados por neuronas. En particular, el VEA TK muestra virulencia reducida para cerdos y otros animales susceptibles pero produce una buena protección (Yokoyama, 1997).

Propiedades fisicoquímicas.

El virus de la EA se inactiva a una temperatura de 60°C en 30-60 minutos. La inactivación del virus a bajas temperaturas es inversamente proporcional al tiempo, aunque resiste bien la congelación (excepto entre -10 y -13°C). Este es un virus que es estable a pH entre 5 y 9. El VEA es muy sensible a los disolventes orgánicos y a los desinfectantes, siendo particularmente sensible al cloroformo y éter. Los derivados fenólicos destruyen completamente el virus en 5 minutos a temperatura ambiente. La inactivación del 90% del virus se puede conseguir con etanol al 70%, con compuestos a base de cuaternario de amonio o bien con hidróxido sódico al 5% (Beer, 1987).

Es capaz de sobrevivir por varias semanas en los cadáveres y en el medio ambiente en general. El virus no muere durante el proceso de maduración de la carne a 4°C. En orina el virus es capaz de sobrevivir durante tres semanas en verano y entre 8 y 18 semanas en invierno, en el estiércol es capaz de sobrevivir un mes durante el verano y dos meses en invierno, además de permanecer estable por 5 semanas en cáscara de

maíz y 3 semanas en alimento húmedo, sobrevive cortos periodos de tiempo en concreto, plantas verdes o heno. El calor, la luz solar directa y las condiciones ambientales sin humedad lo inactivan rápidamente (Murphy, 1999).

4.5. Patogenia.

Los herpesvirus están ampliamente diseminados en la naturaleza, y todas las especies de mamíferos y aves tienen o sufren infecciones por HV (Hans, 2000). La mayoría de los animales domésticos (con excepción del caballo) así como el zorro, el visón y la rata son sensibles a la infección natural. El ganado vacuno se infecta en primer lugar a través de las vías respiratorias y el tracto digestivo, y con menor frecuencia a través de otras mucosas y de las heridas. La sintomatología está muy influida por el punto de entrada y el patrón de distribución del virus por el cuerpo. Las infecciones en el área de la cabeza provocan un cuadro clínico breve de 24 horas, caracterizado por intranquilidad, disnea, prurito, y síntomas de parálisis locales en la zona de la cabeza, contracciones de la musculatura de la cabeza y del cuello, así como timpanismo. Las infecciones de las regiones corporales caudales provocan un cuadro clínico de aproximadamente el doble de duración, caracterizado por prurito de intensidad variable de la región corporal caudal afectada, síntomas de cólico y contracciones de la musculatura abdominal (Beer, 1987).

La fuente principal de infección de los carnívoros reside en la ingestión de carne y órganos de cerdos y lechones infectados. En los carnívoros, la enfermedad cursa con los signos clínicos típicos del sistema nervioso central, con un final letal (Hans, 2000). En el caso de los roedores, los conejos y ratones jóvenes son los más susceptibles al HVP1, mientras que las ratas son bastante resistentes. Los roedores nocivos constituyen un riesgo potencial, ya que actúan como vectores, cuando son expulsados de explotaciones infectadas y llegan a explotaciones próximas (Beer, 1987).

El cerdo, hospedador principal, puede infectarse por vía oral, nasal y genital. Los principales transmisores son los cerdos infectados, aparentemente sanos, que cuando son transportados también son responsables de las contaminaciones a larga distancia. En el cerdo es muy importante la edad del animal para determinar su receptividad a la infección, el cuadro clínico y su curso, así como la letalidad (Mohanty, 1998). Mientras que los lechones lactantes son muy susceptibles y suelen morir, en los animales de mayor edad es frecuente observar resistencias o infecciones clínicamente inaparentes. En explotaciones en las que no hay lechones, se pueden producir infecciones mudas o solo aparecen síntomas respiratorios poco intensos, que casi siempre pasan por alto o se atribuyen a alguna otra enfermedad respiratoria. La capacidad de contagio del virus de Aujeszky hacia los cerdos susceptibles depende de la sensibilidad en función de la edad, o de la resistencia, de la posible inmunización de la explotación y de la concentración de gérmenes en el ambiente (Edwards, 1990, Granoff, 1999).

En las cerdas infectadas bajo condiciones naturales, el VEA entra por vía nasal y de ahí el virus viaja hacia sistema nervioso central y/o tracto respiratorio. El virus es capaz de replicar en monocitos, tal como los macrófagos alveolares, los monocitos infectados pueden viajar por vía sanguínea y transportarse hasta el útero de la cerdas gestantes. El aborto es generalmente la consecuencia de la replicación intraplacentaria e interfetal del virus. Las fallas reproductivas son usualmente observadas entre el día 35 y 75 de gestación (Katayama, 1997).

Formas de transmisión en la especie porcina.

La transmisión directa ocurre, la mayoría de las veces, por vía oronasal o por vía genital, tanto en la monta como en la inseminación artificial a través de semen de animales infectados. Existe la transmisión del virus vía transplacentaria. Los lechones se pueden infectar justo en el momento del nacimiento, en el canal del parto; y durante la lactación, a través de la leche y por contacto directo con la madre (Mohanty, 1998). Puede existir la transmisión en la transferencia de embriones de cerdas donantes infectadas a cerdas sanas (Boehringer, 2000).

La transmisión indirecta se produce 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 alimento o agua contaminados con el VEA; y a través de fomites como vehículos, botas, ropa y jeringuillas (Fenner, 1987).

Dosis infectiva.

La infección vía oral necesita mayores cantidades de virus que la infección vía nasal y los lechones necesitan menores concentraciones de virus para infectarse que los cerdos adultos (lechones 10^1 - 10^3 DICC_{50%}, cerdos jóvenes 10^4 DICC_{50%} y cerdos adultos 10^4 - 10^5 DICC_{50%}) (Boehringer, 2000).

Tropismo y diseminación del virus en el organismo.

En principio la mayoría de las cepas del VEA tienen tropismo por las vías respiratorias altas y el SNC. En condiciones naturales, el virus se multiplica inicialmente en el epitelio de la región nasofaríngea y las tonsilas. La difusión hacia el resto del organismo se produce por vía linfohemátogena hasta los ganglios linfáticos regionales en donde vuelve a multiplicarse produciéndose una diseminación hacia todo el organismo. El virus penetra en el SNC a través de las terminaciones nerviosas del nervio olfatorio, trigémino y glossofaríngeo; a partir de aquí llega a médula oblongada y puente, donde el virus se multiplica en las neuronas (Trigo, 1998; Granoff, 1999). También se observa la multiplicación vírica en las células ganglionares y de la glía. Si se produce la infección en animales adultos con una cepa de baja o moderada virulencia la diseminación del virus queda limitada a estos puntos de entrada del SNC. Pero si la cepa es de virulencia alta existe una diseminación al resto del encéfalo. El periodo de incubación oscila entre un día y un máximo de tres semanas, siendo muy corto en los lechones lactantes. El virus se elimina antes del inicio de los síntomas clínicos y cuando el curso es inaparente, comienza tras un periodo de tres a cinco días postinfección. El virus se aísla de secreciones nasofaríngeas, tanto durante el periodo de incubación como durante la enfermedad manifiesta. También son infecciosas la leche y las secreciones de los órganos sexuales y ocasionalmente de orina e incluso de heces (Hans, 2000).

Cuando se sobrevive a la enfermedad o a una infección inaparente, se produce una inmunidad ligada a las células de forma duradera. Esta inmunidad celular se desarrolla durante la primera semana de la infección, mientras que los anticuerpos humorales se empiezan a detectar durante o al final de la segunda semana. Cuando se ha establecido la inmunidad se detiene la multiplicación del virus, por lo que prácticamente no existen difusores permanentes (Boehringer, 2000).

Sin embargo, una característica de los HV es su capacidad para establecer latencia después de una infección primaria y puede ser reactivado periódicamente en sus

huéspedes naturales, el DNA del virus persiste en las células del sistema nervioso central y de las tonsilas y muy frecuentemente en las neuronas de los ganglios sensoriales más próximos a la puerta de entrada en el organismo a lo largo de toda la vida del animal. No se puede descartar, el papel de otras células en el mantenimiento de la latencia (Beer, 1987).

La latencia por alfa-herpesvirus se caracteriza porque las células infectadas contienen el genoma vírico completo reprimido antes de la síntesis de proteínas alfa, el genoma vírico puede ser activado por una serie de estímulos (Visser, 1989). La duración de la latencia depende del nivel de competencia inmunológica del animal. La infección latente por alfa-herpesvirus puede ser definida como una infección no productiva que, bajo ciertas condiciones, puede ser activada a un tipo de infección lítica convencional con producción de virus. En situaciones de estrés puede reactivarse el genoma vírico y producir una nueva multiplicación vírica. La reactivación del virus latente resulta en la diseminación del virus, mecanismo por el cual resultan las infecciones de tipo endémico (Mengeling, 1992).

Latencia en cerdos.

El VEA puede persistir en gran cantidad de tejidos porcinos después de una infección activa: tonsilas, timo, nódulos linfáticos, pulmones, ganglio trigémino, cerebro, medula espinal, oído interno, médula ósea, macrófagos y linfocitos. El que todos puedan considerarse latentemente infectados o no, dependerá del estado en que se encuentre el genoma vírico y su nivel de represión (Mohanty, 1998).

Ciertos estímulos pueden reactivar el virus latente en condiciones experimentales: los tratamientos inmunodepresores, las fluctuaciones de temperatura o la inducción de estrés (Visser, 1989). Tras la reactivación, la manifestación de signos clínicos es reducida y puede no observarse. Se acompaña de un incremento en el título de anticuerpos frente al virus. La excreción de virus es intermitente durante las tres semanas siguientes al tratamiento inmunodepresor y mucho más reducida que durante la primoinfección aguda. Esta cantidad es suficiente para infectar animales jóvenes sin protección inmune (Boehringer, 2000).

4.6. Cuadro clínico.

El cuadro clínico depende en gran medida de la edad de los cerdos afectados, de la virulencia de la cepa del virus implicada en el proceso y de la dosis infectiva. El VEA tiene tropismo por los tejidos respiratorios y nerviosos. Generalmente los signos nerviosos se observan en animales muy jóvenes mientras que los signos respiratorios se encuentran en cerdos de engorde o adultos. Si los animales poseen inmunidad frente al VEA, esta sintomatología se ve reducida o incluso puede ser inaparente.

Lechones menores de 3 semanas.

En los lechones lactantes, el periodo de incubación es muy corto, de 2 a 4 días. El cuadro clínico además de aumentos de temperatura debidos a la viremia (41°C), ptialismo, anorexia, apatía y vómitos, durante las 24 horas siguientes del inicio del proceso acostumbra a aparecer síntomas relacionados con el SNC, caracterizada por una ausencia o disminución del registro de los estímulos ambientales, inapetencia y a veces completa apatía con agravamiento progresivo en forma de movimientos en círculos, temblores musculares, nistagmus, espasmos clónicos en forma de movimientos de remo

de las extremidades anteriores y posteriores, espasmos tónicos en forma de opistótonos de la cabeza con las orejas tiradas hacia atrás o hacia los lados, hipersalivación en forma de espuma debida a los espasmos de la musculatura de la masticación unidos a una parálisis de la deglución, incoordinación, claudicaciones intensas en forma de ataxia o parálisis con una posición lateral forzada o sentada con las extremidades posteriores abiertas hacia los lados y convulsiones epileptiformes seguidas de coma y muerte a las 24-36 horas del inicio de los primeros signos. La mortalidad en estos casos suele ser del 100%.

Cuando los animales se infectan por vía intrauterina y nacen vivos, suelen morir en los dos primeros días. Si la infección se produce en el momento del parto, aparecen los síntomas durante los dos primeros días y mueren normalmente antes del quinto día. Estos síntomas clínicos no se observan cuando los lechones poseen una buena inmunidad calostrual pudiendo sufrir una infección subclínica.

Además de los síntomas clínicos típicos, pueden aparecer vómitos, pérdida de la voz y neumonía catarral. Se produce la muerte tras una duración de la enfermedad de dos a tres días. En los lechones lactantes la letalidad puede oscilar entre el 50 y el 100%.

Lechones de 3 a 9 semanas.

Los síntomas clínicos que sufren estos animales no son tan graves, aunque un reducido número de animales puede presentar signos nerviosos que finalizan en coma y muerte. La mortalidad varía del 10 al 50%. El periodo de incubación es de 3-6 días, tras los cuales los animales sufren apatía, anorexia y fiebre (41-42°C). A veces, también se observan signos respiratorios como estornudos, secreciones nasales, disnea y tos, todo ello acompañado de pérdida de peso. La duración de los síntomas clínicos suele ser de 5-10 días. Los animales que sufren la infección respiratoria pueden desarrollar infecciones bacterianas secundarias o concurrentes, ya que el VEA interfiere en la función fagocítica de los macrófagos alveolares, reduciendo la capacidad de defensa que poseen estas células frente las bacterias.

Cerdos de engorde (desde 9 semanas hasta el sacrificio)

En estos animales la morbilidad es muy alta, casi del 100%, y la mortalidad (1-2%) suele ser debida a complicaciones. Los signos clínicos aparecen después de 3-6 días de incubación y se observa fiebre (41-42°C), síntomas respiratorios como estornudos, flujo nasal, tos y disnea, somnolencia e inapetencia. Los signos suelen remitir a los 6-10 días, pero durante este periodo los animales sufren una pérdida de peso importante los síntomas de la enfermedad desaparecen a los pocos días y se produce una curación espontánea, aunque los cerdos no alcanzan el peso final de engorde en el tiempo habitual. Los casos más graves con posible final letal acostumbran deberse a infecciones secundarias del tracto respiratorio (debidas a *Pasteurella multocida* o a *Actinobacillus pleuropneumoniae*).

Los signos nerviosos sólo aparecen esporádicamente produciendo temblores musculares y convulsiones violentas, pueden observarse además actividades motoras sin causa aparente de la musculatura de la cabeza, como movimientos masticatorios, de chupado, o chasquidos de la lengua, acompañados de una intensa salivación y formación de espuma.

Cerdos adultos

El cuadro clínico suele ser grave y la mortalidad raramente es superior al 2%. Los síntomas que aparecen son fiebre, inapetencia y problemas respiratorios leves. Los verracos, además, pueden presentar infertilidad transitoria al existir inflamación escrotal por edema subcutáneo, periorquitis y calidad espermática alterada (Murphy, 1999).

En las explotaciones no inmunes puede producirse hasta un 20% de fallos reproductivos cuando las hembras gestantes se infectan. La infección durante el primer tercio de la gestación produce reabsorción del feto y retorno al estro. Si la infección tiene lugar durante el segundo o tercer mes suelen existir abortos, momificaciones o nacimiento de animales muy débiles; el virus puede atravesar la placenta e infectar y producir la muerte de los fetos en el útero. Si la infección de las hembras se produce justo al final de la gestación los lechones pueden nacer infectados y en este caso mueren el primer o segundo día de vida (Hans, 2000).

En las cerdas además de un cuadro clínico respiratorio, esta enfermedad puede causar abortos en estadios posteriores de la gestación o parto de mortinatos o fetos momificados. Las infecciones previas al parto, acostumbran provocar partos de lechones muy débiles o muertos, así como agalactia. Normalmente los trastornos de la fertilidad no afectan a más del 20% de las cerdas gestantes de una explotación. En los sementales afectados se observa una inflamación testicular y trastornos de la maduración de los espermatozoides. Dependiendo de la virulencia del virus, tampoco es raro que los cerdos de mayor edad superen la infección de forma totalmente asintomática (Murphy, 1999, Edwards, 1990).

El prurito que es típico en la enfermedad de Aujeszky en otras especies, casi nunca se observa en los cerdos, y cuando aparece suele ir unido a un comportamiento agresivo (Fenner, 1987).

4.7. Lesiones macroscópicas.

Los cerdos muertos a causa de la infección por el VEA no presentan lesiones macroscópicas características de la misma. Puede existir rinitis desde serosa a fibronécrotica; ganglios linfáticos submaxilares y retrofaríngeos hemorrágicos y edematosos; y necrosis en tonsilas. En el aparato respiratorio se puede encontrar edema, múltiples focos de necrosis, hemorragia en pulmón, neumonía intersticial causada por infecciones bacterianas secundarias y pleuritis (Beer, 1987).

Cuando los animales sufren sintomatología nerviosa se observa una marcada congestión de las meninges acompañada por un exceso de líquido cefalorraquídeo (Trigo, 1998). Puede existir queratoconjuntivitis y también focos necróticos de 2-3 mm de diámetro en la superficie del hígado, bazo y glándulas adrenales. En cerdos jóvenes está descrita la enteritis necrótica en yeyuno e íleon (Granoff, 1999).

Las cerdas recién abortadas sufren endometritis y el útero se vuelve más grueso y edematoso, y se observa placentitis necrótica. Los fetos abortados pueden ser frescos, macerados o momificados. Los fetos frescos y los lechones mortinatos presentan focos de necrosis en hígado y bazo, y focos de necrosis hemorrágicos en pulmón y tonsilas. En los machos se ha descrito edema escrotal y periorquitis (Hans, 2000).

4.8. Respuesta inmune.

Las glicoproteínas de la envoltura del VEA actúan como inmunógenas e inducen la respuesta inmune del animal. Los anticuerpos neutralizantes de la respuesta humoral, se detectan una semana después de la infección y su pico máximo aparece a las 2-3 semanas. La inmunidad mediada por células juega un papel fundamental en la infección por el VEA. Los linfocitos T sensibilizados responden eficazmente a una reinfección al VEA, ya que proliferan, se dividen, excretan citoquinas y destruyen las células infectadas por el virus (Boehringer, 2000). La función primaria de los anticuerpos es la de unirse al antígeno. En algunos casos esta unión tiene consecuencias directas como, por ejemplo, impedir la penetración del virus en la célula; sin embargo, este complejo antígeno-anticuerpo, carece de sentido si no se une a células fagocíticas, sistema complemento, etc., responsables de la inmunidad innata.

Respuesta inmune humoral del cerdo frente al VEA.

Las glicoproteínas de la envoltura del VEA aparecen también en la superficie de las células infectadas por el VEA, lo que permite el reconocimiento y eliminación de estas células. Las glicoproteínas gB, gC y gD son las más inmunógenas en la inducción de la respuesta inmune humoral. Frente a la infección del VEA son necesarios los dos tipos de respuesta inmunitaria, la humoral y la celular. Los anticuerpos neutralizantes frente al VEA se detectan una semana después de la infección y su pico máximo aparece a las 2-3 semanas postinfección, siendo la IgM y la IgG los componentes mayoritarios del suero durante la fase inicial de la infección. La IgA también se detecta en el suero y en las secreciones mucosas de animales infectados o vacunados intranasalmente frente al VEA, pero esta IgA tiene una capacidad neutralizante débil (Boehringer, 2000).

La función de los anticuerpos controlando la infección primaria es limitada ya que aparecen tardíamente. Sin embargo, juegan un papel vital en la reactivación y reinfección, limitando la diseminación y colaborando en la destrucción de las células infectadas por el VEA. Está descrito que la inmunidad calostrual puede durar hasta el segundo o tercer mes de vida de los lechones, sufriendo posteriormente una gran disminución (Pfizer, 2002).

Respuesta inmune celular del cerdo frente al VEA.

La inmunidad mediada por células juega un papel fundamental en la infección por el VEA. Se ha demostrado que los linfocitos T sensibilizados responden eficazmente a una reinfección al VEA, ya que proliferan, se dividen, sintetizan y excretan citoquinas y, como consecuencia, se destruyen las células infectadas por el VEA. La gC y gD son los antígenos diana que inducen la proliferación de las células T en los cerdos positivos a VEA (Boehringer, 2000).

4.9. Diagnóstico diferencial.

La sospecha de la enfermedad de Aujeszky nace cuando se observan los síntomas típicos de origen nervioso central, especialmente en los lechones, y teniendo en consideración el desarrollo epidemiológico en toda la explotación (rápida difusión dentro de los grupos o en grupos de cerdos de la misma edad). Sobre todo son características las actividades motoras sin causa aparente, acompañadas de una alteración simultánea del sensorio (Beer, 1987).

En los lechones se debe diferenciar entre las siguientes enfermedades:

- ❖ Enfermedad de los temblores (temblor de los lechones),
- ❖ Meningitis estreptocócica,
- ❖ Forma atípica de la peste porcina,
- ❖ Enfermedad de Teschen (forma cerebro-medular),
- ❖ Hipoglucemia e hipotermia.

En la enfermedad de los temblores, la peste porcina atípica y la enfermedad de Teschen el sensorio no acostumbra estar alterado, en la hipoglucemia y la hipotermia los lechones acostumbran a estar apáticos y presentan muy poca actividad motora. En la enfermedad de Teschen y la peste porcina atípica predominan las claudicaciones motoras en forma de movimientos atácticos de las extremidades posteriores, y en la enfermedad de Teschen también hay parálisis. Al contrario de lo que sucede en la enfermedad de Aujeszky, en estas dos enfermedades el contagio dentro del grupo o a grupos vecinos es más bien lento. En el temblor de los lechones no se observa ningún contagio al resto de la explotación. 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, las meningitis estreptocócicas y las colienterotoxemias. Los ataques espásticos que aparecen en la intoxicación por sal, unidos a la intensa sialorrea y a la alteración del sensorio son especialmente similares en la enfermedad de Aujeszky. Sin embargo, tal como se ha dicho, esta suele aparecer en lechones lactantes, mientras que en cerdos de mas edad generalmente es asintomática (Fenner, 1987; Beer, 1987).

Con respecto a los problemas de fertilidad se debe establecer el diagnóstico diferencial con el PRRS (Porcine Respiratory and Reproductive Síndrome, por sus siglas en ingles, o aborto tardío), brucelosis, leptospirosis e infecciones por parvovirus y enterovirus (Hans, 2000).

4.10. Diagnóstico.

El diagnóstico de la enfermedad de Aujeszky se basa en la combinación de la historia de la granja, los signos clínicos, las lesiones macro y microscópicas, análisis serológicos y virológicos para la detección o aislamiento del virus (Boehringer, 2000).

4.10.1. Diagnóstico clínico.

Presenta dificultades en casos individuales, pero puede ser establecido cuando se presenta todo un conjunto de síntomas característicos de la EA. como sintomatología nerviosa y respiratoria con alta mortalidad en lechones menores de tres semanas, y cuadro reproductivo en hembras gestantes, con abortos, mortinatos, momificaciones y reabsorción embrionaria (Edwards, 1990).

4.10.2. Estudio Histopatológico.

Las lesiones microscópicas principalmente se encuentran en el SNC, restringidas sobre todo en el cerebro donde se produce una meningoencefalitis no supurativa y ganglioneuritis, con degeneración de las células ganglionares y marcada proliferación de la glía y desarrollo de una discreta mielitis. Las lesiones están presentes tanto en la

materia gris como en la blanca y la distribución depende de la vía de entrada al SNC. Las lesiones se caracterizan por infiltraciones en la glía de forma difusa y local, ocasionalmente combinado con necrosis de neuronas e infiltraciones perivasculares y meníngeas de linfocitos, neutrófilos y macrófagos. Las lesiones en medula espinal son similares a las anteriores, observándose principalmente en las regiones cervicales y torácicas. También se han descrito estas lesiones en plexos y ganglios nerviosos autónomos como los plexos de Meissner y Auerbach, y ganglios cerebroespinal, cardíaco y celíaco (Trigo, 1998).

Son característicos los corpúsculos de inclusión en el núcleo de neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, aunque estos cuerpos de inclusión son más frecuentes en lesiones fuera del sistema nervioso en las células epiteliales de las tonsilas y de la faringe, Además son importantes las lesiones que se producen en las vías respiratorias altas, caracterizadas por la inflamación y necrosis de la mucosa epitelial y el infiltrado de células mononucleares en la submucosa de la faringe, en el pulmón las lesiones consisten en bronquitis necrótica, bronquiolitis y alveolitis, neumonía intersticial y edema pulmonar, la replicación del virus en los macrófagos alveolares hace que éstos tengan disminuida su capacidad de defensa frente a las bacterias predisponiendo al animal a sufrir infecciones secundarias y produciéndose en ese caso pleuroneumonía (Mohanty, 1998; Murphy, 1999).

Tras los abortos se pueden observar endometritis, vaginitis y placentitis, además puede observarse necrosis en diferentes órganos internos como el bazo, ganglios linfáticos, hígado y otros (Trigo, 1998).

4.10.3. Diagnóstico de laboratorio.

Mientras que el aislamiento del virus de la enfermedad de Aujeszky ayuda a un diagnóstico provisional en el caso de las formas letales de la pseudorabia o enfermedad clínica en cerdos, otras técnicas y pruebas serológicas son requeridas para el diagnóstico de infecciones latentes. Algunos animales afectados, excepto cerdos, no viven lo suficiente para producir alguna respuesta serológica (OIE, 2000).

El diagnóstico virológico se apoya en las siguientes posibilidades (Vega, 1995):

1.- Identificación del agente por:

- ❖ Aislamiento el virus en cultivos celulares (del cerebro, amígdalas, pulmones, ganglios linfáticos, fetos abortados);
- ❖ Detección del antígeno vírico mediante técnicas de inmunofluorescencia (en cortes de tejido de los órganos habitualmente afectados como el cerebro y las tonsilas), inmunoperoxidasa, hibridación del DNA o reacción en cadena de la polimerasa (PCR, Polimerase Chain Reaction);

2.- Pruebas serológicas para:

- ❖ Detección de los anticuerpos en el suero mediante ELISA, prueba de neutralización u otros procedimientos serológicos.

Identificación del agente.

El aislamiento del VEA puede realizarse por inoculación de tejidos de animales sospechosos, por ejemplo el cerebro y tonsila o material colectado de la cavidad nasal, en una línea celular susceptible tal como el riñón de cerdo (pk_{15} o sk_6), o células primarias

o secundarias del riñón. La especificidad del efecto citopático es verificada por inmunofluorescencia, inmunoperoxidasa o neutralización con antisuero específico. El virus también puede ser identificado usando PCR, pero esta técnica es muy reciente y aun no está estandarizada (OIE, 2004).

Aislamiento viral.

El diagnóstico de la enfermedad de Aujeszky puede ser confirmado por aislamiento del virus en el fluido orofaríngeo, fluido nasal, biopsia de tonsilas de cerdos vivos, o de las muestras de cerdos muertos (encéfalo, ganglio trigémino, bazo, pulmón, tonsila) o de animales que presentan signos clínicos tales como encefalitis (Mohanty, 1998). Para el aislamiento *postmortem* del VEA, muestras de cerebro y tonsilas son los especímenes de preferencia. En cerdos infectados de manera latente, el ganglio trigémino es el sitio más consistente para aislamiento viral, aunque el virus latente es usualmente de difícil cultivo (Edwards, 1990).

Las muestras se homogenizan en solución salina normal o medio para cultivo celular y la suspensión resultante se clarifica por centrifugación a baja velocidad a 1100 revoluciones por minuto por 10 minutos. El sobrenadante es usado para inocular algunos cultivos celulares sensibles. Numerosos tipos de líneas celulares o cultivo primario de células son sensibles al VEA, pero una línea celular de riñón porcino (pk₁₅) es generalmente empleada. Los medios de cultivo deberán contener antibióticos, tal como 200 UI/ml de penicilina; 100 mg/ml de estreptomycin; 100 mg/ml de polimixina y 3 mg de fungizona.

El VEA induce un efecto citopático (CPE) que usualmente aparece de las 24 a las 72 horas, pero los cultivos celulares pueden incubarse por 5 a 6 días. El monoestrato forma acumulaciones de células birrefringentes, seguidas por desprendimiento completo de la lámina celular. Sincitios pueden también desarrollarse, la apariencia y forma es variable. En ausencia de algunos CPE, es recomendable hacer un pase en cultivos nuevos. Evidencia adicional se obtiene por tinción de cultivos infectados con hematoxilina y eosina para demostrar las características de inclusiones intranucleares acidófilas del herpesvirus con marginación de la cromatina. Para poder diferenciar el efecto citopático del VEA del producido por otros virus o factores tóxicos, se suele recurrir a la inmunofluorescencia directa sobre cultivos celulares infectados, observando al microscopio células muy fluorescentes (OIE, 2000).

El aislamiento del VEA hace posible la confirmación de la enfermedad, pero el no realizar el aislamiento no garantiza la libertad de infección.

Inmunofluorescencia Directa.

Es la técnica más utilizada para la detección de antígenos del VEA en cortes o improntas de tonsilas, encéfalo y faringe de animales sospechosos, o en hígado y pulmón fetal. Esta técnica utiliza inmunoglobulinas específicas conjugadas con isotiocianato de fluoresceína (NOM-007-ZOO-1994).

En el caso del VEA la fluorescencia se distribuye generalmente en el citoplasma de las células infectadas y de forma excepcional en el núcleo. La presencia de cuerpos fluorescentes en un campo de observación indica la presencia del virus de la EA (Vega, 1995).

Inmunoperoxidasa.

Se realiza en forma similar a la técnica de Inmunofluorescencia directa sobre secciones de parafina o improntas de tejido. La reacción positiva se observa tanto en el núcleo como en el citoplasma, dando un depósito marrón-rojizo en esos puntos (NOM-007-ZOO-1994).

Reacción en Cadena de la Polimerasa. Detección del ADN Vírico.

La prueba de PCR puede ser usada para la identificación de genomas del VEA en secreciones o muestras de órganos, como esta técnica aun es muy reciente, no es posible especificar un procedimiento estándar (OIE, 2004).

Las técnicas para detectar el ADN vírico han contribuido significativamente a la rápida y precisa detección del VEA latente. Se han desarrollado técnicas de amplificación genómicas (PCR), que aumentan mucho la sensibilidad para la detección de virus latente en un periodo de tiempo muy corto (< 24h). Además, con ella es posible detectar ADN vírico en biopsias de tonsilas, sin tener que sacrificar al animal, pudiendo evaluar si se ha producido latencia. Mediante la técnica de PCR se puede detectar ADN del VEA en células mononucleares sanguíneas, lo que indica que estas células pueden ser un punto de latencia o de persistencia en ausencia de replicación vírica. Y aunque en ellas el ADN vírico se detecta de forma inconstante, está demostrado que la técnica de PCR en las muestras de células mononucleares sanguíneas es más sensible que el aislamiento vírico (Boehringer, 2000).

Pruebas serológicas.

Los anticuerpos de la EA son demostrados por seroneutralización, aglutinación de látex o ELISA. La técnica de seroneutralización (SN), es reconocida como el método de referencia para serología, pero para propósitos de diagnóstico esta es reemplazada por ELISA porque es apropiada para gran número de muestras (OIE, 2004).

Seroneutralización (SN).

La prueba de virus-neutralización en cultivo celular puede realizarse de distintas formas que varían de acuerdo al tiempo de incubación del virus-suero mezclados (1 hora a 37°C o 24 horas a 4°C) y a la presencia o ausencia de complemento. La sensibilidad de la prueba puede ser mejorada por el incremento en la incubación por 24 horas a 4°C, lo cual facilita la detección de niveles de anticuerpos 10 a 15 veces inferiores por el método de 1 hora. La SN no puede ser usada para diferenciar anticuerpos de origen vacunal de los producidos durante una infección natural. La prueba es capaz de detectar la presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes para el VEA (OIE, 2004).

ELISA monitoreo.

La prueba de ELISA (Enzyme Linked Inmunoabsorbent Assay), para la detección de anticuerpos totales, es una técnica rápida y los resultados que se obtienen son principalmente cualitativos más que cuantitativos, aunque también es posible titular el suero. La correlación entre los títulos por SN y los valores de densidad óptica obtenidos por ELISA es pobre. La técnica ELISA se puede realizar con muestras de suero, plasma, sangre entera, sangre sobre papel de filtro y calostro. Entre las ventajas del ELISA se pueden destacar que la técnica es de corta duración (dos o tres horas), que la toxicidad de los sueros no es ningún problema para su realización, y que los resultados se obtienen mediante una lectura automatizada. Los anticuerpos producidos frente al VEA comienzan

a detectarse por ELISA a partir de los 7-8 días del contacto (Boehringer, 2000; IDEXX, 1999).

ELISA diferencial (Screening).

Tradicionalmente las estrategias usadas para proteger a los cerdos de los efectos de la infección por la enfermedad de Aujeszky han incluido la administración de vacunas convencionales y de ingeniería genética. Los procedimientos serológicos estándar usados para valorar la exposición al VEA después de la vacunación, son de valor limitado ya que ellos no pueden distinguir los cerdos infectados de forma natural de los cerdos vacunados. Los ELISA diferenciales para la gE, gG o gC, son una herramienta esencial en el control de la enfermedad cuando es utilizada junto con vacunas delecionadas gE, gG o gC respectivamente, pudiendo diferenciar animales vacunados de infectados (Vega, 1995). Estos ELISA llamados de competición o bloqueo, se basan en la competencia que se establece por unirse al antígeno vírico entre los anticuerpos específicos de un suero problema y los anticuerpos monoclonales específicos conjugados con una enzima por unirse al antígeno vírico. El ELISA de bloqueo en comparación a la SN detecta niveles más bajos de anticuerpos en suero, además da títulos más elevados que la SN tras una infección experimental. El ELISA gE de bloqueo detecta animales seropositivos a partir del día 8 ó 9 de media posdesafío, mientras que el ELISA gE indirecto, en el que la placa está tapizada con antígeno gE, los detecta a partir del día 9 ó 10 posdesafío. Estos anticuerpos pueden detectarse hasta un año post-inoculación. Los ELISA diferenciales gE y gC tienen la capacidad de detectar anticuerpos en los cerdos infectados de forma latente, mientras que los ELISA gG no los detectan (IDEXX, 1999).

Aglutinación en látex (AL).

Esta técnica se basa en la aglutinación que se produce entre el VEA y anticuerpos anti-VEA, más tarde estos complejos pasan por unas microesferas de poliestireno quedando adheridos a ellas. Comparando esta técnica con otras dos se ha observado que la AL es más sensible que el ELISA y que la SN, pero la SN es la más específica de las tres. Además, la AL es la técnica que detecta más precozmente los anticuerpos (IgM) producidos frente al VEA (se detectan a los 6-7 días post-inoculación), siendo por lo tanto útil en el diagnóstico precoz de la EA. Es una técnica rápida y fácil de realizar, sólo necesita 8 minutos de incubación y muy poco material de laboratorio, todo esto facilita que se pueda realizar directamente en las granjas. Se suele utilizar únicamente como una prueba cualitativa aunque puede servir como cuantitativa (Boehringer, 2000).

4.11. Control y erradicación.

Existen razones económicas, políticas y científicas que hacen recomendable y posible la erradicación de esta enfermedad. Las importantes pérdidas económicas que origina la presencia del virus en un área, región o país vienen determinadas fundamentalmente por la alta mortalidad en lechones, el empleo de programas de vacunación para el control de la enfermedad y las restricciones en la exportación (Fenner, 1987).

Diversas estrategias de control y erradicación se han llevado a cabo para conseguir el saneamiento de las explotaciones por diversas vías:

- *Vaciado de toda la explotación (despoblación-población):* El método más común es despoblar durante un periodo de varios meses a medida que los cerdos alcanzan el

peso de sacrificio. Al mismo tiempo que se venden estos cerdos, las cerdas reproductoras se sacrifican y se trasladan los cerdos de engorde para despoblar la totalidad de la granja. El mejor momento para despoblar es durante los meses de verano, ya que el calor y la sequedad inactivan el VEA rápidamente. Después de la despoblación, toda la granja, incluyendo comederos y bebederos, debe ser lavada y desinfectada. Después de la desinfección, deben dejarse los edificios vacíos durante 30 días por lo menos. La granja se repuebla con cerdos VEA-negativos. La granja puede ser repoblada con primerizas gestantes a punto de parir y así reducir el costo del tiempo no productivo (Arias, 1999).

- *Segregación de los Lechones:* Esta técnica se basa en que el lechón se desteta a una edad temprana (10-21 días de edad) y se traslada a una nave "limpia" apartada de la granja de cerdos. De esta manera el lechón es alejado de la madre antes de que tenga la oportunidad de infectarse a partir de la cerda. En la gran mayoría de casos, los lechones de 3-4 semanas de edad están libres de VEA. Los cerdos segregados deben ser vacunados. Todas las primerizas que den positivo al VEA deben considerarse infectadas y deben separarse del resto de la manada hasta la madurez. Estas cerdas deben ser cubiertas por verracos VEA-negativos y la gestación debe realizarse aisladamente de la granja infectada. En la granja infectada la reproducción generalmente se detiene y las cerdas son sacrificadas después del destete. A medida que las primerizas VEA-negativas se aproximen a la fecha de parto, se trasladan a la granja original que debe estar despoblada en ese momento (Boehringer, 2000).
- *Diagnóstico, Sacrificio y Reposición:* Hay tres pasos para realizar un programa de diagnóstico, sacrificio y reposición (Hans, 2000):
 1. Disponer de un lote de reproductoras no infectadas.
 2. Esto incluye asegurarse de que el VEA no está presente en los cerdos de engorde en la granja con controles serológicos regulares.
 3. La diseminación del VEA en la granja de reproducción debe ser baja o inexistente. Todos los verracos y cerdas infectados deben ser detectados y eliminados de la granja.
- *Manejo-Vacunación:* En este programa se espera a que la seroprevalencia decline en la granja a medida que los verracos y cerdas seropositivos sean sacrificados y reemplazados por reproductores seronegativos como parte de un programa normal de reemplazo. El plan vacunal aplicable a cada granja dependerá de la prevalencia existente en cada una de las áreas (reproductores y engorde). La granja se define como libre de virus cuando todos los individuos son seronegativos a través de una muestra representativa de la granja reproductora con un predeterminado nivel de confianza y una prevalencia mínima que puede detectarse (Arias, 1999). La probabilidad de éxito depende de varios factores: el tamaño de la granja, las prácticas de manejo y los objetivos del productor. Además, algunas cepas víricas son menos virulentas que otras y deberían ser más fáciles de eliminar (Boehringer, 2000).

Cada plan tiene sus ventajas y aplicaciones propias. Cuatro factores principales influyen en la decisión sobre el plan a elegir (Granoff, 1999):

- a) La prevalencia del VEA en la granja.
- b) La necesidad financiera de eliminar el VEA lo más rápidamente posible.

c) El costo de cada plan.

d) La prevalencia del VEA en un área determinada y el riesgo de reinfección.

Factores que hacen recomendable la erradicación de la enfermedad (Arias, 1999):

- ❖ Altas tasas de mortalidad y enfermedad en cerdos, fundamentalmente lechones. Alta mortalidad en hospedadores no porcinos (rumiantes, carnívoros).
- ❖ Restricción en las exportaciones.
- ❖ Empleo de programas de vacunación de forma generalizada para controlar la enfermedad.

Factores epidemiológicos que favorecen la erradicación (Beer, 1987):

- ❖ El cerdo es básicamente la única fuente de infección, y al mismo tiempo el único reservorio del virus.
- ❖ Las rutas de transmisión son bien conocidas : contacto directos entre cerdos, vía aerógena, vectores indirectos.

La inactivación del virus es sencilla, mediante los procedimientos habituales de limpieza y desinfección.

4.12. La vacuna con delección gE del virus de la Enfermedad de Aujeszky.

4.12.1. Vacuna inactivada.

La Enfermedad de Aujeszky es una afección viral que causa grandes pérdidas económicas en la industria porcina. Esta afecta a todos los estratos de la población causando problemas reproductivos en el pie de cría, alta mortalidad en lechones y en los cerdos de engorda baja mortalidad y predisposición a enfermedades respiratorias (Sánchez, 2002).

Actualmente en nuestro país, los programas de control se basan en el uso de vacunas inactivadas con delección gI⁻ (cepa Bartha), señaladas en la NOM-048-ZOO-1996, Requisitos mínimos para las vacunas contra la Enfermedad de Aujeszky, publicada el 6 de febrero de 1996, así como mediante el uso de vacunas atenuadas con delección gI⁻ tales como Aujeszky-Vac, Ingelvac-Aujeszky KV, Panky-Vac, Pr-Vac, Aujy-plus gI⁻ (PEV, 2003), obtenidas a partir de múltiples pases en animales, huevos o cultivos celulares originarios de hospedadores naturales.

Las ventajas de las vacunas que contienen microorganismos muertos o atenuados, consisten en que son seguras con respecto a la virulencia residual y relativamente fáciles de almacenar (Tizard, 1989). No todas inducen una respuesta de anticuerpos, esto debido a la poca cantidad de antígeno o bien porque el adyuvante no es el adecuado (Diosdado, 1999).

4.12.2. Vacuna viva deletada.

El conocimiento del genoma del virus de la EA demostró a mediados de los años 80 que algunas de las cepas virales, utilizadas para la elaboración de vacunas vivas atenuadas (tabla 2, Anexo: página 51), presentaban una delección en la región Us de su genoma que afectaba a los genes que codifican las glicoproteínas gE (antes denominada gl) y la actual gl (antes gp 63). Así la cepa Bartha K/61 presentaba una delección en la región Us que afectaba a la gE y la actual gl. La cepa NIA-4 también presenta una delección en la región Us y por tanto no expresa la proteína gE. La cepa Alfort 26 presentaba una delección en las fracción Us pero sólo afectaba a la expresión de la actual gl y no de la gE. Por todo ello, las vacunas producidas con estas cepas inducían buena protección en los animales, pero no inducían anticuerpos frente a la proteína gE, por lo que los animales vacunados con ellas podían ser diferenciados de los animales infectados, ya que el virus que produce la enfermedad si presenta la proteína gE (Arias, 1999).

Los hallazgos mencionados estimularon la investigación molecular sobre el virus de la EA. Mediante técnicas de ingeniería genética, se iniciaron diferentes trabajos para eliminar genes que codificaban o bien proteínas ligadas a la virulencia (timidín-kinasa) o proteínas que, como la gE, no son importantes en la inducción de la respuesta inmune pero que contribuyen a la virulencia y permitía diferenciar las cepas vacunales (vacunas genéticamente marcadas). Así, se obtuvieron cepas menos virulentas, al eliminar el gen de la timidín-kinasa y marcadas, al eliminar el gen de la gE (Sánchez, 2002). Las vacunas de nueva generación presentan un patrón de respuesta similar al de las vacunas inactivadas convencionales, la gran ventaja es, que al no estar formadas por la totalidad de la estructura del agente infeccioso, es posible diferenciar serológicamente a los animales vacunados de los animales enfermos. Esta particularidad es aún más importante en las vacunas vivas deletadas, las cuales, al ser vacunas vivas, presentan una mejor respuesta inmune que las de proteínas inactivadas (Arias, 1999).

Estas vacunas generan protección contra la presentación de la enfermedad y reducen la tasa de infección y la eliminación viral y pueden hacer posible generar una mayor seguridad y vacunación más práctica que las vacunas convencionales. En particular, las vacunas recombinantes de ingeniería genética con múltiples delecciones hace posible crear cepas vacunales que no son viables para revertir a la virulencia (Campomanes, 2000).

Las cepas vacunales más importantes obtenidas por técnicas de ingeniería genética desde el punto de vista de su empleo actual en vacunas comerciales válidas para control de la EA en Europa, Norte América y Japón, son la cepa 783 gE-/Tk-, la cepa Begonia gE-/Tk-, la cepa Alfort 26 gE-/Tk-, las cuales muestran reducida virulencia para cerdos y otros animales susceptibles pero produce una buena protección (Arias, 1999, OIE, 1992). Las vacunas preparadas a partir de cepas que no expresan la glicoproteína gE, han sustituido a las vacunas convencionales preparadas a partir de cepas virulentas. La mayoría de ellas contienen adyuvantes oleosos, aunque están apareciendo nuevas vacunas eficaces con adyuvantes acuosos, que evitan las posibles reacciones adversas en el punto de inoculación (Arias, 1999).

La vacunas gE- vivas e inactivadas son las únicas autorizadas en la Unión Europea y en otros países, en los programas actuales de vacunación-erradicación. El

empleo de vacunas marcadas vivas o inactivadas generan mecanismos de inmunidad frente a la infección por el VEA que inducen protección. Sin embargo, los niveles y el tipo de mecanismos efectores inducidos son diferentes (Sánchez, 2002). Estas diferencias están relacionadas con una mayor eficacia en cuanto a la generación de niveles óptimos de protección, referido a una reducción significativa de los niveles y de la duración de excreción viral, y a la prevención de la disminución en la ganancia de peso. Algunos estudios indican que niveles óptimos de protección se consiguen cuando se emplean vacunas vivas (Visser, 1989). Otros trabajos señalan que en los días inmediatamente posteriores a la infección la utilización de vacunas vivas previenen de forma más efectiva que las inactivadas una disminución en la ganancia de peso. Por otro lado, en los estadios tempranos de la infección por VEA, la aparición de respuestas linfoproliferativas se ha relacionado con una reducción de la excreción viral y este tipo de respuesta es de mayor magnitud después de la inmunización con vacunas vivas (Pensaert, 1990).

Tanto las vacunas vivas como las inactivadas son eficaces en la protección frente a los síntomas clínicos de la enfermedad y la infección letal, aunque existen diferencias en cuanto a la obtención de niveles óptimos de protección, dependiendo de múltiples parámetros como el genotipo vacunal, la ruta de administración, el uso de adyuvantes, el programa de vacunación empleado, el nivel de exposición al virus virulento o el nivel de anticuerpos maternos que presentan los lechones en el momento de la vacunación (Diosdado, 1999). Estos parámetros influyen de forma significativa en la reducción de la excreción viral, en el establecimiento de latencias y en la reactivación del virus de campo.

Principales condicionantes en la efectividad de las vacunas (Arias, 1999):

- ❖ Genotipo vacunal adecuado a la situación epidemiológica.
- ❖ Programa de vacunación empleado.
- ❖ Nivel de exposición al virus virulento (presión infectiva).
- ❖ Nivel de anticuerpos maternos en el momento de la vacunación.

La experiencia obtenida en los últimos años ha demostrado que los programas de vacunación intensiva con vacunas de virus vivo gE- han sido eficaces en el control de los síntomas clínicos y en una reducción manifiesta de la diseminación del virus de campo, lo que apoyado con medidas adicionales para reducir la transmisión, está permitiendo que muchos países realicen importantes avances o se encuentren en las fases finales de la erradicación (Campomanes, 2000).

4.13. Programas de vacunación.

Los esquemas vacunales a aplicar varían de una región a otra. Dependiendo del estatus positivo o negativo de la granja debe desarrollarse un adecuado programa de vacunación, tomando en cuenta diferentes criterios.

- ❖ Conocer cual es la situación de la explotación antes de iniciar un programa de vacunación es de gran importancia y utilidad para lograr los mejores resultados. Los perfiles serológico aportan datos sobre la presencia de virus circulante, la prevalencia del virus en cada explotación, si este proviene del exterior o a través de reposiciones (Pensaert, 1990).

- ❖ Es importante recordar que ninguna vacuna viva o inactivada produce una inmunidad permanente y son necesarias dosis de refuerzo. Por otro lado, la inmunidad que confiere puede variar en función de las condiciones genéticas e individuales de cada animal. En las explotaciones vacunadas va a disminuir en gran medida un número de casos clínicos, pero si la presión infectiva es alta, los animales vacunados pueden cada día ser infectados, aunque son necesarias un mayor número de dosis infectivas para que se produzca la infección. Si esto ocurre, la duración de la viremia y la excreción del virus por estos animales va a ser significativamente menor disminuyendo por lo tanto la diseminación del virus (Arias, 1999).
- ❖ Aunque la vacunación no proporciona una protección absoluta ni evita el establecimiento de infecciones latentes los datos disponibles de estudios experimentales y de la experiencia en el campo indican que en las explotaciones bien vacunadas existe una incidencia menor de nuevas infecciones y una menor posibilidad de reactivaciones, disminuyendo progresivamente la circulación del virus y la prevalencia hasta valores que posibiliten su eliminación total (Diosdado, 1999).
- ❖ La primovacunación de lechones con anticuerpos maternos juega un papel fundamental en la efectividad de los programas vacunales. Si la vacunación de lechones se realiza cuando aun existen anticuerpos maternos, no se produce una inmunización efectiva, resultando ineficaz por fenómenos de interferencia calostrual, dejando un lechón desprotegido (Boehringer, 2000).
- ❖ Cuando se emplean vacunas vivas, la presencia de altos niveles de anticuerpos maternos impide la multiplicación de la cepa vacunal. La realización de seroperfiles en lechones es en este caso de gran interés, ya que ofrecerán información sobre la cinética de anticuerpos maternos presentes en los lechones y por lo tanto cual es el mejor momento para la primovacunación (Arias, 1999).
- ❖ Distintos estudios demuestran que este problema disminuye si se administra una vacuna viva por vía intranasal donde se estimula fundamentalmente una inmunidad local en la mucosa oronasal, puerta de entrada del virus de campo (Boehringer, 2000).
- ❖ El uso de una doble vacunación a las 10 y 14 semanas puede reducir la tasa de infección de forma más importante que con una única dosis vacunal (Pfizer, 2002).
- ❖ La eficacia de la vacunación va a influir también sobre las consecuencias de una posible reactivación viral en animales infectados de forma latente. En poblaciones bien vacunadas la diseminación del virus por animales infectados de forma latente son de menor relevancia aunque, estos animales deben ser eliminados en las fases finales de los programas de erradicación. Los animales infectados de forma latente con bajos niveles de inmunidad vacunal, representan un peligro constante ya que en caso de reactivación viral, el sistema inmune es incapaz de eliminar, convirtiéndose en una fuente de infección para la población (Arias, 1999).
- ❖ Las vacunaciones deben ser realizadas de forma disciplinada y correcta ya que las poblaciones deficientemente vacunadas originan animales desprotegidos. Las

explotaciones deficientemente vacunadas y las subpoblaciones no vacunadas juegan el papel más importante en la aparición de nuevas infecciones, particularmente en las zonas de alta densidad porcina, donde existe un movimiento frecuente de animales entre explotaciones. Estas poblaciones pueden comprometer el éxito del programa de erradicación (Beer, 1987).

- ❖ Las explotaciones de cebo infectadas juegan también un papel muy significativo en el mantenimiento del virus en zonas de alta densidad porcina. En explotaciones donde persiste el VEA es necesario revisar las medidas de manejo y adaptarlas para reducir la diseminación del virus, y minimizar el contacto entre grupos. La repetida introducción de reposiciones no controladas serológicamente o procedentes de explotaciones donde existe circulación viral conduce a la aparición de olas de infección (Pensaert, 1990).
- ❖ La respuesta inmune protectora puede no ser estimulada si los animales están incubando una enfermedad de tipo infeccioso, se encuentran inmunocomprometidos o bajo condiciones de estrés o la vacuna no es administrada de acuerdo a las indicaciones del laboratorio (Pfizer, 2002).

V. OBJETIVO GENERAL.



Evaluar la efectividad, seguridad y contagiosidad de dos vacunas comerciales elaboradas con virus vivo modificado con delección gE-, de la Enfermedad de Aujeszky ante el desafío de una cepa Becker patógena para cerdos, así como constatar el cumplimiento de los requisitos y las características de calidad de pureza, esterilidad, identidad, titulación, origen de la cepa y pruebas fisicoquímicas, que deben reunir para su empleo en apoyo a la Campaña Nacional contra la Enfermedad de Aujeszky en nuestro país.

VI. OBJETIVOS PARTICULARES.



- Realizar a dos lotes de vacuna de virus vivo modificado con delección gE- contra la Enfermedad de Aujeszky. las pruebas de control de calidad con las que deben cumplir antes de salir al mercado.
- Evaluar la eficacia de dos vacunas contra la Enfermedad de Aujeszky de virus vivo modificado con delección gE- como método de control en la diseminación de la enfermedad.
- Evaluar la contagiosidad o diseminación del virus vacunal en animales de convivencia no vacunados.
- Evaluar la seguridad de la vacuna al aplicar 10 dosis del biológico en animales de edad susceptible.
- Contribuir, con estos estudios, en la instrumentación de las disposiciones legales para establecer los requisitos mínimos de calidad que deben cumplir las vacunas vivas modificadas con delección gE- empleadas en la prevención y control de la Enfermedad de Aujeszky.
- Conocer las técnicas de diagnóstico más empleadas para la detección del virus de la Enfermedad de Aujeszky y a partir de las cuales se realizan las diferentes pruebas de constatación.

VII. JUSTIFICACIÓN.



Debido a la importancia económica de la especie porcina, ocupando el segundo lugar en lo que se refiere a producción de toneladas de carne, por lo que con el fin de elevar la producción, así como mejorar la calidad de los productos porcinos, resulta necesario establecer el control y erradicación de la Enfermedad de Aujeszky, permitiendo con esto que la porcicultura se desarrolle en mejores condiciones económicas y sanitarias.

Es necesario garantizar que la producción de vacunas contra la EA, sea de la mas alta calidad para inmunizar a las piasas que así lo requieran, por lo que los biológicos utilizados para prevenir la enfermedad en los cerdos deben de reunir ciertas características de calidad, ya que la vacunación es una estrategia básica en las zonas en control de la Campaña Nacional contra la Enfermedad de Aujeszky, debido a que permite reducir la incidencia de esta enfermedad y por consiguiente salvaguardar la inversión que representa la piara nacional.

Con el fin de asegurar la calidad de las vacunas vivas modificadas con delección gE- contra la EA, ya sean importadas o elaboradas en la Republica Mexicana, las empresas que registran de la vacuna deben demostrar, mediante pruebas de laboratorio efectuadas en el Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal (CENASA), o en un laboratorio de pruebas aprobado, que cumplen con los requisitos mínimos de calidad que especifica la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA).

En el presente año, la SAGARPA a través del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Protección Zoonitaria (CONAPROZ) y con la colaboración de empresas particulares y especialistas en la producción porcina, esta llevando a cabo la modificación de la NOM-048-ZOO-1996 con lo que se pretende incorporar a las vacunas de virus vivo modificado con delección gE- contra la Enfermedad de Aujeszky, estableciendo los requisitos mínimos de calidad con los que estas deben cumplir para su liberación al mercado.

VIII. MATERIAL Y MÉTODO



8.1. Pruebas realizadas a los lotes de vacuna de virus vivo modificado contra la Enfermedad de Aujeszky para su constatación.

Debido a que las vacunas de virus vivo modificado con delección genética contra la Enfermedad de Aujeszky, no están contempladas dentro de las Normas Oficiales Mexicanas, las empresas titulares del producto presentan el protocolo de control de calidad de las pruebas a efectuar conforme lo establece la 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, que junto con los estándares establecidos por la Organización Mundial de Salud Animal y el Código Federal de Regulaciones, se llevan a cabo los procedimientos de constatación y control de calidad de estas vacunas.

Por lo anterior, las vacunas de virus vivo modificado con delección genética contra la Enfermedad de Aujeszky, ya sean importadas o producidas en el país, deben mostrar por medio de pruebas de laboratorio que cumplen con los siguientes requisitos:

1. **Prueba de determinación de vacío:** El 100% de la muestra representativa del lote debe tener vacío (NOM-063-ZOO-1999).
2. **Prueba de determinación de humedad:** El 100% de la muestra representativa del lote de la vacuna liofilizada debe tener un porcentaje de humedad igual o menor a 4% (NOM-063-ZOO-1999).
3. **Prueba de pureza:** La vacuna debe estar libre de bacterias aerobias y anaerobias, micoplasmas, hongos, levaduras, así como de cualquier otro agente biológico contaminante (CFR9, 2004).
4. **Prueba de identidad:** Las vacunas contra la EA deben estar elaboradas con una cepa estandarizada del virus de la EA. Las vacunas vivas modificadas usan numerosas cepas para su producción, tal como Bartha, Bucharest o Iowa o son derivados de un aislamiento original de la cepa NIA-3 (OIE, 2004).
5. **Prueba de ausencia de virus contaminantes:** Las vacunas deben mostrarse libres de: Parvovirus porcino, Paramixovirus porcino, virus de la Fiebre Porcina Clásica, virus de la Diarrea Viral Bovina, Síndrome Respiratorio y Reproductivo del Cerdo, y otros agentes extraños (CFR9, 2004). Usando una cantidad de antisuero monoespecífico, la cepa vacunal viva es neutralizada e inculada en cultivo celular sensible a los virus patógenos mencionados y son determinados por anticuerpos fluorescentes, u otros procedimientos (OIE, 2004).
6. **Prueba de titulación:** Los biológicos con agentes virales activos deben reunir los requisitos mínimos de titulación para asegurar que su contenido viral es igual o mayor al indicado en el protocolo de manufactura y suficiente para inducir una protección en la especie de destino (NOM-063-ZOO-1999).

7. **Origen de la cepa:** La cepa vacunal debe estimular la producción de anticuerpos séricos contra el VEA y no debe estimular la producción de anticuerpos séricos contra la glicoproteína E (OIE, 2004).
8. **Prueba de potencia:** Una dosis de vacuna debe proteger por lo menos al 80% de los cerdos desafiados por vía intranasal con una cepa virulenta del virus de la EA que tenga no más de tres pases en células de riñón de cerdo, el cual debe tener un título como mínimo de 10^5 DICC_{50%} y debe ser de la cepa Becker u otra cepa estandarizada, así mismo, cuando menos el 80% de los cerdos controles deben enfermar o morir por la EA durante el periodo de observación posdesafío de 14 días (NOM-048-ZOO-1996). En general, la eficacia de las vacunas después del desafío se evalúa por comparación de signos clínicos, temperatura rectal y pérdida de peso, pero también y de mayor importancia, la mortalidad en cerdos no vacunados. Los títulos de anticuerpos son de poca importancia para evaluar la eficacia de las vacunas. La pérdida de peso comparada entre los animales vacunados y controles es ciertamente el parámetro más confiable cuando las condiciones de desafío van a ser estandarizadas (OIE, 2004).
9. **Prueba de seguridad:** La vacuna no debe causar enfermedad ni alteraciones en la salud de los cerdos vacunados con 10 dosis administrados en una sola aplicación, para efectos de control de calidad, cada lote del biológico debe ser probado en la especie a la cual se destina. La administración de una sobredosis hace posible detectar reacciones no producidas bajo condiciones normales de uso y que pudieran pasar inadvertidas cuando se vacunan gran número de animales. Las reacciones locales y generales deben examinarse (OIE, 2004).
10. **Prueba de cohabitación:** El 100% de los cerdos que cohabiten con cerdos vacunados deben resultar negativos a la detección de anticuerpos séricos contra el VEA. La habilidad de las vacunas de VEA para difundirse de un cerdo vacunado a uno no vacunado es probada colocando 2 cerdos no vacunados en contacto con 2 cerdos vacunados por la ruta que representa el mayor riesgo de difusión que recibieron 10 dosis de la vacuna a probar (OIE, 2004).

8.2. Desarrollo del trabajo.

El presente trabajo fue realizado en el Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal (CENASA) organismo perteneciente a la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), ubicado en el km. 37.5 de la carretera México-Pachuca en Santa Ana Tecámac, Estado de México. Las pruebas son realizadas en el área de Constatación del CENASA la cual cuenta con instalaciones para alojamiento de los animales en proceso de prueba, alojamiento para animales bajo prueba y área para control de calidad de los productos biológicos como lo especifica la NOM-029-ZOO-1995, Características y especificaciones para las instalaciones y equipo de los laboratorios de prueba y/o análisis en materia zoonosanitaria, publicada el 24 de enero de 1995 en el Diario Oficial de la Federación.

En base a lo establecido en la NOM-048-ZOO-1996, el Manual de Estándares de Diagnóstico de la Organización Internacional de Epizootias, el Dossier de Producción del laboratorio productor y el Código Federal de Regulaciones, se realizó la constatación de 2 lotes de vacuna liofilizada de virus vivo modificado gE- Δ Tk- contra la Enfermedad de

Aujeszky, preparadas a partir de la cepa Bucharest y Begonia, citopáticas en cultivo de células e inmunogénicas en cerdos susceptibles de cualquier edad.

El día 23 de agosto del 2002 ingresaron 47 cerdos de 10 semanas de edad de 10-12kg de peso al área de cuarentenaria del CENASA, procedentes de las granjas PIC México (Granja fuente: Xaratanga, Sonora) los cuales son empleados para las pruebas in vivo de constatación y control de calidad de las vacunas y que fueron agrupados de acuerdo a las pruebas a realizar y a la vía de inoculación como sigue:

Vacuna 1	
Potencia	10 cerdos vacunados por vía intranasal con una dosis de 2 ml 1ml/fosa nasal.
Seguridad	2 cerdos vacunados con 10 dosis de vacuna (2ml/fosa nasal y 16ml/IM).
Cohabitación	2 cerdos no vacunados se colocan junto a los de la prueba de seguridad.
Control	5 cerdos no vacunados.
Vacuna 2	
Potencia	10 cerdos vacunados por vía intramuscular con una dosis de 2 ml/cerdo.
Seguridad	2 cerdos vacunados con 10 dosis de vacuna (2ml/fosa nasal y 16ml/IM).
Cohabitación	2 cerdos no vacunados se colocan junto a los de la prueba de seguridad.
Control	5 cerdos no vacunados.

Los cerdos fueron mantenidos con una dieta a base de alimento concentrado para la etapa de crecimiento y agua a libre acceso. La vía de inoculación empleada fue la recomendada por el laboratorio productor para cada una de las vacunas.

El día 26 de agosto del 2002, fueron tomadas muestras sanguíneas prevacunales de cada uno de los cerdos por venopunción de la vena cava anterior colocando al cerdo en decubito dorsal en el lugar donde permanecerá aislado. El suero se separa por coagulación de la sangre y es probado para comprobar la ausencia de anticuerpos específicos contra la Enfermedad de Aujeszky mediante la técnica de Seroneutralización que se describe a continuación (OIE, 1992):

Prueba de Seroneutralización.

1. El complemento es destruido colocando las muestras de suero en baño María a 56°C por 30 minutos.
2. Agregar a cada uno de los pozos de la microplaca de fondo plano 50 microlitros de medio (LE + bicarbonato de sodio).
3. Agregar 50 microlitros del suero problema en el pozo A1 y realizar diluciones seriadas (2, 4, 8, 16, etc.), y se continua en el pozo B1 con 50 microlitros de otro suero problema y continuar de igual manera con el resto de las muestras.
4. A cada pozo de la microplaca se agregan 50 microlitros de virus que contenga 50-300DICC_{50%}/50microlitros obtenido por dilución del virus de título conocido con MEM.
5. La placa se agita y coloca en una incubadora por 1 hora a 37°C (CO₂ opcional).
6. 150 microlitros de la suspensión de células conteniendo aproximadamente 150,000 células por mililitro se añaden a cada pozo.
7. La placa se cubre (para incubación en CO₂), y se coloca una cinta adhesiva alrededor de los bordes de la placa para mantenerla sellada y evitar la deshidratación.

8. La placa se agita ligeramente para obtener una distribución de las células en el fondo de los pozos y colocada en una incubadora a 37°C (CO₂ opcional).
9. Controles, cada una de las placas incluye los siguientes controles:
 - ❖ Virus control: esto es para verificar la cantidad de virus actualmente usado para esta prueba. La dosis de virus usada (50-300DICC₅₀/0.1ml) es diluida con MEM a 1/10, 1/100 y 1/1000. De cada dilución, 100 ml se colocan en 4 pozos, se incuban por 1 hora a 37°C. La suspensión de células se adiciona en la misma forma que para el suero bajo prueba.
 - ❖ Control celular: 150 ml de suspensión de células y 100 ml de MEM se colocan en por lo menos una fila.
 - ❖ Suero control positivo: Se emplea un suero de título conocido de anticuerpos específicos contra el VEA. 5 diluciones se preparan en la misma forma como para el suero bajo prueba; realizando diluciones dobles 1:2, 1:4, 1:8, etc.
 - ❖ Suero control: Para verificar la ausencia de efecto tóxico en el suero sobre las células. Los pozos que contienen 50 ml de suero se incuban por 1 hora a 37°C en presencia de 50 ml de medio. 150 ml de la suspensión celular se añade en la misma forma que para el suero bajo prueba.
 - ❖ Suero control negativo: Se trabaja de igual forma que el suero bajo prueba.

Para la lectura de los resultados se empleo un microscopio invertido (100x) para examinar los pozos, para la detección de CPE o efectos tóxicos después de 48 a 72 horas. Los controles tienen los siguientes resultados con lo cual la prueba se considera como válida:

- ❖ Virus control: El título de la suspensión viral se encuentra entre 50-300DICC₅₀/50ml.
- ❖ Control celular: La lámina celular esta intacta.
- ❖ Suero control positivo: El título obtenido es igual al título predeterminado en una dilución del suero.
- ❖ Suero control negativo: El CPE esta presente.

Para los sueros bajo prueba se obtuvieron los siguientes resultados:

- ❖ Presencia de CPE en todos los pozos a los 3 días = resultado negativo; no hay anticuerpos capaces de neutralizar al virus en una dilución final del suero de 1:2 por lo que la lámina celular se observa destruida. Este resultado fue observado en cada uno de los sueros sometidos a prueba.

Los resultados que se obtuvieron de la prueba de Seroneutralización confirman la ausencia de anticuerpos específicos contra la EA, con lo cual el día 30 de agosto del 2002, se da por iniciada la prueba de potencia la cual se describe a continuación:

Pruebas *in vivo*. Anexo 1:

Equipo, reactivos, material, biológicos y condiciones ambientales necesarias para la realización de la prueba.

8.2.1. Prueba de potencia ; se realizó conforme lo establecido en la NOM-048-ZOO-1996 y se complementó con lo señalado en el Manual de Pruebas para Diagnóstico y Vacunas de la OIE, 2004.

Procedimiento:

1. Fueron reconstituidas y homogenizadas las vacunas a probar con su respectivo diluyente en forma estéril.
2. Se conservaron los frascos a una temperatura de refrigeración de 4°C hasta el momento de la aplicación.
3. Se emplearon 10 cerdos para cada lote de vacuna y se administraron a cada uno una cantidad determinada de virus vacunal por el método recomendado por el laboratorio, y fueron agrupados como se observa en la tabla 3 (Anexo: página 52).
4. Los cerdos fueron mantenidos dentro del área de Cuarentenaria por los siguientes 21 días.
5. 5 cerdos por cada lote de vacuna se emplearon como animales testigo no vacunados.
6. Durante los siguientes 21 días los cerdos se observaron para verificar la ausencia de presentación de signos clínicos o reacciones adversas que pudieran ser atribuidas a la vacuna.
7. Se registraron diariamente las temperaturas rectales de cada uno de los animales en una bitácora.
8. Previo al desafío tanto los cerdos vacunados como los testigos se trasladaron al área de corraletas de Alta Seguridad.

Desafío.

- ❖ El día 23 de septiembre. 21 días después de la vacunación, son tomadas muestras sanguíneas de los cerdos vacunados y los cerdos testigo (de ambas vacunas), para obtener el suero y realizar las pruebas de ELISA monitoreo y ELISA diferencial.
- ❖ El mismo día, los cerdos vacunados y los cerdos testigo se desafiaron dentro de las corraletas del área de alta seguridad con una cepa patógena de VEA con un título de $10^{5.8}$ DICC_{50%}/ml y aplicada por vía intranasal, el inoculo de VEA se preparó a partir de cultivos celulares y se suspendió en medio de LE con pH de 7.4 y los cerdos fueron inoculados con 2 ml de la suspensión (1 ml por cada fosa nasal).

Periodo de observación post-desafío.

- ❖ Por los siguientes 14 días las temperaturas rectales se registraron en una bitácora, así como la presentación de signos clínicos de todos los animales.
- ❖ A los cerdos que murieron durante el periodo de observación post-desafío se les realizó la necropsia para confirmar la presencia del VEA. Realizando la toma y envío de muestras de tonsila, pulmón, lóbulo olfatorio del cerebro y ganglio trigémino para su análisis en las áreas de diagnóstico del CENASA (Histopatología, Virología de cerdos). Transcurridos 14 días post-desafío y finalizado el periodo de observación posdesafío, los cerdos son sacrificados por electroinsensibilización, como se indica en la NOM-033-ZOO-1995. Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres, del 7 de julio de 1995, colocando los electrodos en contacto con la piel de los animales previamente mojados por 3 o 4 segundos para provocar una insensibilización suficiente que permita el desangrado indoloro del animal.

Interpretación de resultados de la prueba de potencia.

1. La prueba será considerada como SATISFACTORIA cuando al menos el 80% de los animales testigo presentan signos severos de afección nerviosa y/o respiratoria o muerte por la EA y por lo menos el 80% de los animales vacunados permanezcan vivos y libres de signos característicos de la EA durante el periodo de observación de 14 días posdesafío.
2. Los resultados diferentes a los señalados se considerarán INSATISFACTORIOS.
3. El virus de desafío deberá ser capaz de producir signos característicos y/o muerte por la EA, mínimo en el 80% de los cerdos testigo. En caso contrario la prueba se considerará inconclusa y deberá repetirse.
4. De no repetirse, la prueba se considerará INSATISFACTORIA.
5. El laboratorio productor deberá especificar en la etiqueta del producto que los animales vacunados en contacto con el virus de campo de la EA pueden presentar fiebre y signos respiratorios leves como: tos y estomudos.

El día 30 de agosto del 2002, y una vez confirmada la ausencia de anticuerpos contra la EA, se inicio la prueba de seguridad y cohabitación y se describen a continuación:

8.2.2. Prueba de seguridad; se realizó conforme lo establecido en el Manual de Pruebas para Diagnóstico y Vacunas de la OIE, 2004.

Técnica aplicada

1. Se reconstituyo la vacuna a probar con su diluyente respectivo.
2. Se administraron a cada cerdo (para cada lote de vacuna) 10 dosis de virus vacunal (20ml de vacuna: 2ml por fosa nasal y 8ml vía intramuscular de cada lado por detrás de las orejas).
3. Por los siguientes 21 días los cerdos se observaron para determinar la presencia de reacciones adversas que pudieran ser atribuidas a la vacuna.
4. Las temperaturas rectales se registraron diariamente en una bitácora a lo largo del periodo de observación.
5. Terminado el periodo de observación, el 23 de septiembre, se tomaron muestras sanguíneas para obtener el suero, los cuales se probaron por la técnica de ELISA monitoreo y diferencial.

Interpretación de resultados de la prueba de seguridad.

1. El lote de vacuna se declarara SATISFACTORIO cuando los cerdos vacunados con 10 dosis se mantienen sanos, libres de signos clínicos y no presentan reacciones adversas atribuibles a la vacuna.
2. En caso de observarse signos de enfermedad que no se atribuyen a la vacuna, la prueba deberá repetirse.

8.2.3. Prueba de cohabitación; se realizó conforme lo establecido en el Manual de Pruebas para Diagnóstico y Vacunas de la OIE, 2004.

Técnica aplicada

1. Los cerdos sin vacunar utilizados para esta técnica se colocaron en la corraleta de los cerdos empleados para la prueba de seguridad.
2. Los cerdos se observaron diariamente y se registro en una bitácora la temperatura rectal por los siguientes 21 días.

3. Terminado el periodo de observación, el día 23 de septiembre, se toman muestras sanguíneas para obtener el suero y ser probados por la técnica de ELISA monitoreo y diferencial.

Interpretación de los resultados de la prueba de cohabitación.

Se considerara SATISFACTORIA la prueba cuando no se detectan anticuerpos séricos contra la EA en la prueba de ELISA monitoreo y diferencial.

Las pruebas de laboratorio (in vitro, pruebas fisicoquímicas) se realizaron de acuerdo a los siguientes procedimientos:

Pruebas fisicoquímicas. Anexo 2:

Material, equipo, biológicos y condiciones ambientales necesarias para la realización de las pruebas.

8.2.4. Prueba de determinación de vacío; se realizó conforme lo establecido en la NOM-063-1999.

Procedimiento: La prueba fue realizada en un cuarto oscuro dirigiendo el rayo de corriente eléctrica de la lámpara de Tessler a cada uno de los frascos de vacuna liofilizada, a una distancia de no más del 5 mm de la tapa de aluminio; si existe vacío en el frasco de vacuna a probar el rayo de corriente eléctrica iluminará el interior de este con una luz que va de verde a violeta. El total de frascos de la muestra fue probado y el resultado fue emitido en porcentaje (%).

8.2.5. Prueba de determinación de humedad; se realizó conforme lo establecido en la NOM-063-1999.

Procedimiento:

- Los pesafiltros limpios fueron colocados por 1 hora en una estufa de secado a 60°C.
- Una vez secos los pesafiltros y se colocaron en una atmósfera seca para adquirir la temperatura del cuarto.
- Se retiro el tapón de los frascos de vacuna liofilizada, permitiendo que el vacío salga lentamente y el aire seco entre.
- La muestra liofilizada se homogenizo con una espátula y fue transferida a 2 pesafiltros previamente pesados y cubiertos con su respectiva tapa.
- El pesafiltro con la muestra se peso inmediatamente (PI).
- Los pesafiltros se colocaron en el Vacuometro, y la tapa de cada uno se colocó sin cubrirlos por completo.
- La presión del equipo se redujo hasta 1mm de mercurio y el termostato a 60°C durante 3 horas.
- Terminado el tiempo de secado, el equipo se apago, las tapas se colocaron inmediatamente en su posición normal y los pesafiltros se trasladaron en un desecador para permitir el enfriamiento a temperatura del cuarto.
- Cada uno de los pesafiltros con la muestra se retiro del desecador y se peso inmediatamente (PF).
- Para obtener el peso inicial y el peso final de la muestra se resto el peso del pesafiltro vacío a cada uno de los valores y se calculo la pérdida de secado por la diferencia de pesos con la siguiente fórmula:

PS = PIM – PFM

Donde: PIM = peso inicial de la muestra en gramos
PFM = peso final de la muestra en gramos
PS = pérdida de peso durante el secado

Para obtener el porcentaje de humedad original de la muestra, se utilizo la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Humedad} = \% \text{ PS} = (\text{PS/PI}) \times 100$$

Pruebas *in vitro*. Anexo 3:

Material, equipo, medios de cultivo, reactivos, biológicos, condiciones ambientales, vestuario y equipo de seguridad necesarios para la realización de las pruebas.

8.2.6. Prueba de pureza; se realizó conforme lo establecido en el Código de Regulaciones Federales, 2004.

Procedimiento:

- a) Se reconstituyeron de manera aséptica ambas vacunas, en un área limpia, previamente sanitizada, sin corrientes de aire y trabajando entre mecheros Bunsen.
- b) Se probaron 2 frascos de cada lote de vacuna.
- c) Se realizó la siembra en medios sólidos tomando la muestra con asa bacteriológica por estría, mientras que para los medios líquidos la toma de muestra se realizó con jeringa estéril (tabla 4. Anexo: página 55).
- d) Se inoculo una serie de 5 tubos con medio líquido y 2 cajas con medio sólido incluyendo los testigos y controles de medio no inoculados.
- e) Los medios se identificaron e incubaron a temperaturas de 37°C para detección de bacterias y 22°C para detección de hongos con sus respectivos controles negativos no inoculados.
- f) Los medios inoculados se observaron diariamente y fueron anotados los cambios que pudieron observarse durante los 14 días de prueba.

Interpretación de los resultados de la prueba de pureza: En los casos en que la mezcla enturbia el medio y la presencia o ausencia de contaminación no se puede determinar por observación visual, se transfiere el medio a otros tubos sin inocular entre el día 3 o 7 de incubación, continuando con la primera incubación de los medios de cultivo por 14 días. Si no existe crecimiento de contaminantes en ninguno de los medios empleados al termino del periodo de incubación, el producto será considerado satisfactorio a la prueba de pureza.

Criterios de análisis en caso de contaminación.

1. Si se observa crecimiento pero existe evidencia de contaminación accidental, o los testigos están contaminados, repetir la prueba con el mismo número de muestras que en el primer análisis.
2. Si hay crecimiento en la prueba pero en los testigos no, repetir la prueba con igual número de muestras e iniciar el aislamiento
3. Si hay crecimiento en la segunda prueba, realizar una tinción de Gram, y si existe coincidencia en la morfología del agente encontrado en el primer ensayo, el producto es insatisfactorio.

8.2.7. Prueba de identidad; se realizó conforme lo establecido en el Manual de Pruebas para Diagnóstico y Vacunas de la OIE, 2004.

Procedimiento:

1. Se retiró el medio de los tubos Leighton y se infectó cada uno con 0.2 ml de vacuna reconstituida y diluida 1:300 (aproximadamente 200DICC_{50%}) con LE.
2. Se incubaron los tubos durante 1 hora, moviendo suavemente cada 15 minutos.
3. Se retiró el inoculo y se agregó a cada tubo 1.5ml de MEM adicionado con 6% de SFB y 1.5% de bicarbonato de sodio.
4. Se incubaron los tubos durante 5 días a 37°C.
5. Las laminillas se retiraron de los tubos Leighton con ayuda de una espátula pequeña y, tomándolas con pinzas, se realizó un ligero lavado de cada una en agua destilada.
6. Las laminillas se montaron en una gradilla y se fijaron en acetona durante 20 minutos a temperatura de -20°C.
7. Se sacaron las laminillas de la acetona y fueron teñidas con el conjugado de anticuerpos fluorescentes del VEA de título conocido.
8. Nuevamente se incubaron durante 45 minutos a 37°C en cámara húmeda.
9. Una vez terminada la incubación, se sacaron las laminillas de la cámara húmeda y se realizaron dos lavados en agua destilada con duración de 5 minutos cada uno.
10. Se secaron las laminillas y fueron montadas sobre un portaobjetos limpio con aceite de inmersión.
11. Por último se realizó la observación al microscopio de epifluorescencia.

Interpretación de los resultados de la prueba de identidad: En los cultivos celulares infectados con el virus vacunal y teñidos con un conjugado de anticuerpos fluorescentes, se deberán observar focos de fluorescencia específica.

8.2.8. Ausencia de virus contaminantes; se realizó conforme lo establecido en el Código de Regulaciones Federales 2004, y se complementó con lo señalado en el Manual de Pruebas para Diagnóstico y Vacunas de la OIE, 2004.

1. Procedimiento para detección de contaminación por virus hemaglutinantes y/o hemoadsorbentes:

- a) Se realizó en un tubo de vidrio estéril, una dilución 1:2 de la vacuna reconstituida y suero hiperinmune contra el VEA inactivado previamente a 56°C por 30 minutos.
- b) Se incubó en estufa bacteriológica a 37°C durante 60 minutos.
- c) Se extrajo el medio de cultivo de 10 botellas que contienen monoestrato de la línea celular Pk₁₅.
- d) Se añadió 0.5ml de la mezcla vacuna-suero hiperinmune en cada una de las botellas con Pk₁₅ y se extendió el inóculo sobre la superficie del monoestrato incubando a 37°C en la estufa durante 1 hora, moviendo suavemente las botellas cada 15 minutos.
- e) 4 botellas no inoculadas se usaron como controles negativos a los cuales se les agregó medio mínimo esencial (MEM) adicionado con el 1.5% de una solución de bicarbonato de sodio al 1%.
- f) Una vez terminada la incubación, se adicionó a todas las botellas 5 ml de MEM más 1.5% de bicarbonato de sodio, manteniéndolas en incubación a 37°C por aproximadamente 7 días y se realizó un pase en cultivos celulares nuevos,

permaneciendo en incubación durante otros 7 días, observándose diario para detectar efecto citopático o cualquier otro cambio en la morfología de las células registrándose en una bitácora.

- g) Al término del periodo de incubación, se recuperó el medio y se lavaron todas las botellas 2 veces con PBS.
- h) Se inoculó 0.5ml de la suspensión de glóbulos rojos de ave y cuye al 0.2% a cada una de las botellas (4 botellas con GR de cuye y 4 botellas con GR de ave), incluyendo los controles negativos (2 con GR de ave y 2 con GR de cuye).
- i) La mitad de las botellas se incubaron a 37°C por 30 minutos y el resto a 4°C durante 1 hora (2 botellas con GR de ave, 2 botellas con GR de cuye, 1 control negativo con GR de ave y 1 control negativo con GR de cuye para cada incubación).
- j) Pasado el tiempo de incubación para cada uno de los grupos, las botellas se observaron en un microscopio invertido para localizar la formación de "rosetas de hemoadsorción".
- k) Se recuperó el fluido de cada una de las botellas en tubos de ensayo estériles, el medio se centrifugó y se realizó la prueba de Hemoaglutinación (HA) empleando una microplaca de 96 pozos como a continuación se describe.
 - Con una pipeta se depositaron 30 microlitros de solución de PBS en una microplaca de 96 pozos con fondo en "U",
 - Se agregaron 30 microlitros del medio recuperado de cada una de las botellas en 2 pozos para cada muestra.
 - Se agregaron 30 microlitros de la suspensión de glóbulos rojos de ave al 0.5% (1 pozo por muestra) y de cuye al 0.5% (1 pozo por muestra) y se homogenizó agitando suavemente.
 - Se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos y se realizó la lectura.

2. Procedimiento para detección de contaminación por el virus de la Fiebre Porcina Clásica, Diarrea Viral Bovina y Síndrome Respiratorio y Reproductivo del Cerdo:

- a) Se retiró el medio de los tubos Leighton para cultivo celular con monoestrato confluyente de línea celular ST, MA104 y MDBK, se inocularon con 0.2ml de la mezcla vacuna-suero hiperinmune y se incubó a 37°C durante 1 hora moviendo suavemente los tubos cada 15 minutos a fin de posibilitar la adsorción.
- b) Al mismo tiempo se inocularon controles positivos para cada uno de los agentes con 200 DICC_{50%}, los cuales se trataron al igual que los cultivos a prueba.
- c) Se emplearon 2 tubos con cultivos celulares para cada uno de los agentes como controles negativos no inoculados.
- d) Una vez terminado el periodo de incubación se eliminó el inóculo y se agregó a cada uno de los tubos 1.5 mililitros de MEM adicionado con 3% de SFB y 1.5% de bicarbonato de sodio e incubó durante 3-4 días a 37°C.
- e) Terminado el periodo de incubación se examinó el cultivo al microscopio para la detección de ECP o indicios de toxicidad.
- f) En el caso del aislamiento para la DVB puede realizarse un pase a un cultivo celular nuevo incubando por 3 días.
- g) Se sacaron los cubreobjetos de los tubos realizando un ligero lavado con agua destilada y fijando en acetona durante 15 minutos a 20°C,
- h) Se sacaron los cubreobjetos y se tiñeron con un conjugado específico de fluorescencia para el diagnóstico de la FPC, PRRS y DVB de título conocido.

- i) Se incubaron a 37°C por 45 minutos en cámara húmeda.
- j) Se realizaron dos lavados en agua destilada con duración de 5 minutos cada uno.
- k) Se dejaron secar los cubreobjetos y se montaron sobre un portaobjetos con glicerina buferada o aceite de inmersión.
- l) Se realizó la observación al microscopio de epifluorescencia.

Interpretación de los resultados de la prueba de ausencia de virus contaminantes.

El lote de vacuna será considerado SATISFACTORIO cuando no se observe efecto citopático alguno y no se haya observado hemoadsorción, hemoaglutinación, ni focos de fluorescencia específica en los tubos empleados para las pruebas incluidos los controles negativos.

8.2.9. Prueba de titulación se realizó conforme lo establecido en la NOM-063-1999 y se complementó con lo señalado en el Manual de Procedimientos Técnicos de la PRONABIVE.

Procedimiento:

- a) Se preparo la cantidad necesaria de LE más bicarbonato de sodio para realizar las diluciones de la vacuna a titular.
- b) Se elimino el medio de las microplacas con monoestrato de cultivo celular sensible a EA.
- c) Se identificaron 6 tubos de ensayo estériles dependiendo de la dilución que le corresponda y se colocaron en una gradilla.
- d) Fueron realizadas diluciones decimales seriadas base 10 (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , etcétera) de la vacuna previamente reconstituida, de acuerdo al siguiente esquema:

Tubo No.	-1	-2	-3	-4	-5	-6
Medio de cultivo celular (LE)	2.7ml	2.7ml	2.7ml	2.7ml	2.7ml	2.7ml
Muestra del producto	0.3ml					
Transferir	0.3ml	0.3ml	0.3ml	0.3ml	0.3ml	0.3ml
Dilución final	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}

- e) Se identificaron las microplacas con cada una de las diluciones para cada vacuna, y se inocularon 8 pozos por cada dilución con 0.1ml.
- f) Se dejaron 2 filas no inoculadas como control celular y se les agrego 0.1ml de LE más bicarbonato.
- g) Se realizaron las diluciones 10^1 , 10^2 y 10^3 del virus de referencia con 50-300 DICC_{50%}.
- h) Se sellaron las orillas de la microplaca y se incubo a 37°C por 72-96 horas (CO2 opcional).

Interpretación de los resultados de la prueba de titulación: La lectura de las placas se realizo contando el número de pozos por dilución donde se observo efecto citopático (aglomeración celular en forma de racimos, redondeamiento celular), el resultado se calculo mediante el método de titulación de Spearman-Karber.

8.2.10. Origen de la cepa; se realizó conforme lo establecido en el Manual de Pruebas para Diagnóstico y Vacunas de la OIE, 2004.

Procedimiento:

- Se tomaron muestras sanguíneas de todos los cerdos utilizados para las diferentes pruebas para obtener el suero.
- Cada una de las muestras se probaron por la técnica de ELISA monitoreo.
- Una vez obtenidos estos resultados, el suero de los animales que resultaron positivos a la detección de anticuerpos contra el VEA se probaron por la técnica de ELISA diferencial.

Interpretación de los resultados: En los cerdos empleados para la prueba de potencia y seguridad se deberán detectar anticuerpos séricos contra el VEA, mientras que los cerdos empleados como control y los cerdos de la prueba de cohabitación deberán permanecer como negativos.

Los cerdos que resulten positivos en la ELISA monitoreo (potencia y seguridad), deberán mantenerse negativos a la producción de anticuerpos contra la glicoproteína E en la prueba de ELISA diferencial.

IX. RESULTADOS.



9.1. Pruebas in vivo:

Prueba de potencia:

Esta prueba para la vacuna 1 se considera SATISFACTORIA presentando un 90% de protección (tabla 7 y 8. Anexo: páginas 57-58) con una dosis de 2 ml/IN (1 ml por fosa nasal) de la vacuna ante un desafío que mato al 100% de los cerdos control, los cuales presentaron signos clínicos y lesiones características de la Enfermedad de Aujeszky (tabla 9. Anexo: página 58).

Para la vacuna 2, la prueba es SATISFACTORIA, presentando un 90% de protección (tabla 7 y 8. Anexo: páginas 57-58) con una dosis de vacuna de 2 ml/IM (detrás de las orejas) ante un desafío en el que el 100% de los animales control presentaron signos clínicos y el 40% murió a causa del VEA (tabla 9. Anexo: página 58).

Entre los días 3 y 8 posdesafío los signos clínicos de los cerdos testigo no vacunados incluyen: disnea, tos, estornudos, depresión, temblores musculares, secreción nasal y anorexia, todos los cerdos cursaron con un periodo febril.

Los cerdos testigo con número de identificación 34, 35, 38, 46 y 450 para la vacuna 2, y 445 y 430 para la vacuna 1 que murieron entre los días 6 y 14 del periodo de observación post-desafío (tabla 9. Anexo: página 58) presentaron además signos de afección nerviosa tales como: incoordinación, postración, movimientos en círculos, temblores musculares, nistagmus, espasmos clónicos en forma de movimientos natatorios o de carrera de las extremidades anteriores y posteriores, parálisis y muerte a las 24-36 horas de iniciados los signos nerviosos.

Resultados de la necropsia:

Los cerdos con número de identificación 430 y 445 (vacuna 1), 46 y 450 (vacuna 2), fueron remitidos al área de necropsias para su estudio.

Los cambios más notorios observados en estos cerdos fueron: rinitis de tipo serosa, los ganglios linfáticos retrofaríngeos edematosos y con pequeñas áreas hemorrágicas, focos necróticos de las tonsilas, pequeñas áreas focales de necrosis en los pulmones, además de edema y hemorragias, una marcada congestión de las meninges, focos necróticos en hígado y bazo.

Debido a que los hallazgos a la necropsia no nos confirman la causa de muerte, son remitidas muestras para su análisis virológico e histopatológico a las áreas de diagnóstico responsables.

El análisis histopatológico mostró una meningoencefalitis no supurativa con infiltración linfocitaria perivascular y cuerpos de inclusión intranucleares en astrocitos.

El estudio virológico de las muestras de tejido, confirma el aislamiento del VEA, realizado en la línea celular ST donde se pudo observar la presencia de efecto citopático 36 horas

después de la inoculación y confirmando por inmunofluorescencia directa en los cultivos celulares empleados.

Con los resultados anteriores se confirma que los animales testigo murieron a causa del VEA de desafío y que por lo tanto la prueba se considera como válida y satisfactoria.

Prueba de seguridad o inocuidad:

En esta prueba se comprobó que las vacunas no causan alteraciones en la salud de los cerdos (tabla 10. Anexo: página 59) vacunados con 10 dosis del producto reportándose como SATISFACTORIA y comprobando que la vacuna es inocua y no se observo reacción en el sitio de inoculación (IM).

Prueba de cohabitación:

Los cerdos colocados con los animales de la prueba de seguridad, no mostraron signos clínicos de la EA (tabla 10. Anexo: página 59), así mismo, no se determino la presencia de anticuerpos séricos contra el virus de la Enfermedad de Aujeszky y se confirmo la ausencia de anticuerpos contra la glicoproteína E, por lo que la prueba es considerada como SATISFACTORIA.

9.2. Pruebas fisicoquímicas:

Prueba de vacío:

En cada uno de los viales de muestra probados para ambas vacunas se confirmó la presencia de vacío, observándose que en los frascos de vacuna el paso del haz de corriente eléctrica ilumino el interior de cada uno con una luz de intensidad violeta.

Con lo anterior se remite un resultado SATISFACTORIO de la prueba con un total del 100% de vacío para ambas vacunas.

Prueba de humedad:

Los resultados para las dos vacunas analizadas, y probadas por duplicado, fueron los siguientes:

	# PF	PPFV	PPF/M	M	MS	PS	%H	Promedio
Vacuna 1	65	13.0241	13.1230	0.0989	13.1224	0.0006	0.6%	0.47%
	66	12.9274	13.0151	0.0877	13.0148	0.0003	0.34%	
Vacuna 2	67	13.0668	13.1589	0.0921	13.1577	0.0012	1.3%	1.15%
	68	12.5341	12.6218	0.0877	12.6209	0.0009	1.01%	

#PF = Número del pesafiltro; PPFV = Peso del pesafiltro vacío; PPF/M = Peso del pesafiltro con muestra; M = Muestra; MS = Muestra después del secado; PS = Pérdida al secado; %H = porcentaje de humedad.

Debido a que las especificaciones indican un 4% máximo de humedad para las vacunas liofilizadas, ambas vacunas son consideradas como SATISFACTORIAS.

9.3. Pruebas in vitro:

Prueba de pureza:

Esta prueba se considera SATISFACTORIA ya que no se presentó crecimiento alguno en los medios de cultivo empleados. La prueba para detección de micoplasmas es satisfactoria pues a los 28 días de incubación no se observó cambio de color en los medios o crecimiento de colonias.

Ausencia de virus contaminantes:

Las vacunas analizadas para ausencia de virus contaminantes son consideradas como SATISFACTORIAS ya que no se observó efecto citopático en ninguna de las botellas con cultivo celular empleadas en la prueba lo cual demuestra que la vacuna utilizada está libre de virus contaminantes citopatogénicos.

No se comprobó la presencia de virus hemoaglutinantes ni hemoadsorventes al realizar la prueba de HA a los fluidos obtenidos de los cultivos celulares inoculados con cada una de las vacunas, por lo que se considera como SATISFACTORIA a la ausencia de virus específicos hemoaglutinantes y/o hemoadsorventes.

En los tubos y placas de cultivo celular empleados para comprobar la ausencia de virus de la Fiebre Porcina Clásica (FPC), Síndrome Respiratorio y Reproductivo del Cerdo (PRRS) y Diarrea Viral Bovina (DVB) no fueron observados focos fluorescentes al ser teñidos con anticuerpos fluorescentes específicos, por lo que la prueba se considera como SATISFACTORIA a la ausencia de estos agentes virales.

Prueba de titulación:

Una vez realizada la lectura de las placas, procedemos a la titulación de los resultados, para lo cual empleamos el método de Spearman-Kärber (Farmacopea, 1994) que a continuación se describe:

- Se disponen los datos obtenidos en forma tabular.
- Se abarcan todas las diluciones, tanto las más bajas donde se obtienen todas las respuestas positivas, como las diluciones más altas donde se obtienen todas las respuestas negativas.
- Se separan el número de respuestas positivas y negativas.
- Se obtiene el porcentaje de respuestas positivas y negativas.

Vacuna	Vacuna 1						Vacuna 2					
Diluciones	-1	-2	-3	-4	-5	-6	-1	-2	-3	-4	-5	-6
Resultados	8/8	8/8	8/8	8/8	7/8	3/8	8/8	8/8	8/8	8/8	6/8	0/8
Pozos positivos	8	8	8	8	47	3	8	8	8	8	6	0
Pozos negativos	0	0	0	0	1	5	0	0	0	0	2	8
% de positividad	100	100	100	100	87.5	37.5	100	100	100	100	75	0
% de negatividad	0	0	0	0	22.5	62.5	0	0	0	0	25	100

- A partir de este cuadro se calcula en primer lugar el título del virus con la siguiente fórmula:

$$\text{Logaritmo de la dilución 50\%} = [D_{100} - r/2 + \{r (\sum TP/P)\}] \times -1$$

- En donde:

- D₁₀₀ = La última dilución que presenta el 100% de positividad.
- r = El logaritmo del factor de dilución (Log de 10 = 1).
- ∑ = Suma de términos.
- TP = Total de positivos en cada dilución comprendidos entre el 100 y 0% de positividad.
- T = Total de tubos inoculados en cada dilución.

- Así tenemos que para cada una de las vacunas:

Vacuna 1
$\begin{aligned} \text{Logaritmo de la Dilución 50\%} &= [4 - \frac{1}{2} + \{1(\sum 8/8 + 7/8 + 3/8)\}] \times -1 \\ &= [3.5 + \{1(1 + 0.875 + 0.375)\}] \times -1 \\ &= [3.5 + 2.25] \times -1 \\ &= -5.75 \\ \text{Título} &= 10^{-5.75} \text{DICC}_{50\%}/1\text{ml} \\ &= 10^{-6} \text{DICC}_{50\%}/\text{dosis (2ml)} \end{aligned}$
Vacuna 2
$\begin{aligned} \text{Logaritmo de la Dilución 50\%} &= [4 - \frac{1}{2} + \{1(\sum 8/8 + 6/8 + 0/8)\}] \times -1 \\ &= [3.5 + \{1(1 + 0.75)\}] \times -1 \\ &= [3.5 + 1.75] \times -1 \\ &= -5.25 \\ \text{Título} &= 10^{-5.25} \text{DICC}_{50\%}/1\text{ml} \\ &= 10^{-5.5} \text{DICC}_{50\%}/\text{dosis (2ml)} \end{aligned}$

Con estos resultados podemos concluir que las vacunas analizadas son consideradas como SATISFACTORIAS ya que cumplen con los requisitos de titulación antes mencionados.

Origen de la cepa:

Para determinar la presencia de anticuerpos séricos contra el virus de la Enfermedad de Aujeszky y la ausencia de anticuerpos contra la glicoproteína E, se utilizaron kits de ELISA HerdChek de IDEXX de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las muestras se trabajaron por duplicado y las densidades ópticas (DO) se obtuvieron a través de un lector de ELISA a una longitud de onda de 630nm, en los que se obtuvieron los datos mostrados en la tabla 5 y 6 (Anexo: páginas 55-57) .

Resultados de la prueba de ELISA a la detección de anticuerpos séricos contra el VEA:

Para que el ensayo sea válido, la media A(650) del control positivo menos la media A(650) del control negativo debe ser mayor o igual a 0.150.

Control negativo = $0.080 + 0.078 + 0.078 = 0.236/3 = 0.078$

Control positivo = $0.306 + 0.311 + 0.318 = 0.935/3 = 0.311$

La diferencia entre el control positivo y negativo es de 0.233, con lo que podemos considerar como válido el ensayo.

Interpretación:

1. Si el cociente S/P es menor que 0.4 la muestra se clasifica como negativa hacia los anticuerpos contra el VEA.
2. Si el cociente S/P es mayor o igual a 0.4 la muestra se clasifica como positiva hacia los anticuerpos contra el VEA.

Cálculos:

1. Promedio del control positivo: $NCx = A1A(650) + A2A(650) + A3A(650) / 3$
2. Promedio del control negativo: $PCx = A4A(650) + A5A(650) + A6A(650) / 3$
3. Cálculo del cociente S/P: $S/P = (A(650) \text{ muestra}) - (NCx) / (PCx) - (NCx)$

Promedio del factor S/P obtenido para cada grupo de prueba:

Grupos	Potencia	Testigo	Cohabitación	Seguridad	Especificaciones
Vacuna 1	3.2912 D.O	-0.1176 D.O	-0.1202 D.O	3.3476 D.O	Potencia y Seguridad Positivo ≥ 0.4 D.O.
Vacuna 2	4.045 D.O	-0.1043 D.O	-0.1073 D.O	5.9528 D.O	Testigo y Cohabitación Negativo ≤ 0.4 D.O

Con los datos anteriores podemos concluir que la prueba de ELISA Screening presenta resultados dentro de las especificaciones antes mencionadas, con lo cual es considerada como SATISFACTORIA (tabla 5. Anexo: página 55-56).

Resultados de la prueba de ELISA a la detección de anticuerpos contra gE del VEA:

Para que el ensayo sea válido, la media A(650) del control positivo menos la media A(650) del control negativo debe ser mayor o igual a 0.3.

Control negativo = $1.459 + 1.486 + 1.433 = 4.378/3 = 1.459$

Control positivo = $0.187 + 0.179 + 0.184 = 0.55 = 0.1833$

Dado que la diferencia entre el control negativo y el positivo es de 1.276, podemos considerar como válido el ensayo.

Interpretación:

- 1) Si la inhibición es mayor o igual al 40% la muestra se clasifica como positiva de anticuerpos contra el antígeno gE del VEA.
- 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 gE del VEA.
- 3) Si la inhibición es menor o igual al 30% la muestra se clasifica como negativa de anticuerpos contra el antígeno gE del VEA.

Cálculos:

4. Media del control negativo: $NCx = A1A(650) + A2A(650) + A3A(650) / 3$
5. Media del control positivo: $PCx = A4A(650) + A5A(650) / 2$
6. Cálculo de la inhibición %: $[NCx - (A(650) \text{ muestra}) / NCx] \times 100$

Promedio del porcentaje de inhibición obtenido para cada grupo de prueba:

Grupos	Potencia	Cohabitación	Seguridad	Especificaciones
Vacuna 1	14.5065%	12.5428%	12.5339%	Potencia, Seguridad y Cohabitación
Vacuna 2	14.1912%	14.2906%	14.6504%	Negativo < 30% Inhibición

Los resultados que la prueba de ELISA gE presenta, cumplen con las especificaciones antes mencionadas, con lo cual se considera SATISFACTORIA (tabla 6. Anexo: página 57).

Prueba de identidad:

En las laminas de cultivo celular empleados para esta prueba, al ser teñidos con conjugado de anticuerpos fluorescentes específicos al VEA, se observaron focos de fluorescencia de coloración intensa en el citoplasma de las células, con lo cual se demuestra que las vacunas están elaboradas con una cepa estandarizada del VEA y se consideran como SATISFACTORIAS a la prueba de identidad.

X. DISCUSIÓN.



Si bien es cierto que la vacunación de cerdos en áreas donde el VEA es endémico puede reducir las pérdidas al aplicar vacunas atenuadas o inactivadas, no previenen la infección o el establecimiento de latencia por el virus de campo (Fenner, 1987), además no todas estas vacunas empleadas para inmunización de las piaras en México inducen una respuesta adecuada de anticuerpos, ya sea por la poca cantidad de antígeno o porque el adyuvante no es el adecuado (Campomanes, 2000).

En el momento actual de la campaña de control y erradicación de la Enfermedad de Aujeszky, es evidente la necesidad de disponer de vacunas que posean una eficacia óptima. Para que una vacuna sea capaz de prevenir la circulación y perpetuación del virus de Aujeszky en una explotación porcina, es necesario que dicha vacuna pueda prevenir el establecimiento de latencia en los animales que hayan sobrevivido a la infección aguda ya que los animales que sobreviven a la infección por el virus de campo pueden convertirse en portadores de la enfermedad por establecimiento de un estado de latencia en ciertos tejidos neuronales específicos, esencialmente en los ganglios sensoriales, trigémino y espinal (Boehringer, 2001).

El reciente progreso en el desarrollo de vacunas DNA recombinante para modificar los virus ha proveído la oportunidad para definir con mayor precisión las características de los virus vacunales, tal es el caso del desarrollo de la vacuna contra el VEA.

Mediante técnicas de ingeniería genética, se iniciaron diferentes trabajos para eliminar genes que codifican proteínas ligadas a la virulencia (timidin-quinasa) o proteínas que, como la gE, no son importantes en la inducción de la respuesta inmune y permitía diferenciar las cepas vacunales. Así, se obtuvieron cepas menos virulentas y por lo tanto mucho más seguras, al eliminar el gen timidin-quinasa y marcadas, al eliminar el gen gE (Boehringer, 2001).

En algunos estudios realizados para evaluar la capacidad de este tipo de vacunas al evitar el establecimiento de latencia del VEA en una vacuna de virus vivo modificado cepa Begonia usando cerdos vacunados de 5 días de edad, 3 meses después de la vacunación los cerdos se trataron con prednisolona (15mg/kg de peso corporal) por 4 días consecutivos. 3 semanas después del tratamiento fueron tomadas muestras de tejidos y se examinaron para aislamiento viral, en ninguno de los animales fue encontrada reactivación viral (Gillespie, 1999).

La seguridad de las vacunas de EA con delección ha sido extensamente investigada (Mengeling, 1992), presentando características tales como: avirulencia para cerdos jóvenes, no diseminación o transmisión hacia cerdos en contacto, estabilidad genética al realizar una serie de pases en lechones, no inducción de latencia viral, no presenta transmisión de madres a hijos, no es patógena para hospedadores no porcinos.

La eficacia de estas vacunas ha sido evaluadas ampliamente (Visser, 1989) y todas ellas han mostrado ser más eficaces que las vacunas atenuadas convencionales,

debido a que protegen a los cerdos de la presentación de signos clínicos severos y la muerte después del desafío con un VEA virulento. Por lo tanto las condiciones experimentales usados en estas pruebas de eficacia varían a nivel de campo, por ejemplo, por la raza y edad de los cerdos, la cantidad de virus vacunal administrado, el periodo entre la vacunación y el desafío, la cepa vacunal y el título de desafío, el método de evaluación de la protección, la inmunogenicidad de las glicoproteínas eliminadas y la habilidad para replicar en el cerdo (Katayama, 1997).

A pesar de esto, la vacunación de los cerdos en áreas donde el virus es endémico, ya sea con vacuna de virus vivo modificado o inactivado, es capaz de reducir las pérdidas por la presentación de la enfermedad (Beer, 1987).

La disponibilidad de vacunas marcadas genéticamente contra el VEA ha estimulado nuevos esfuerzos para el control y erradicación de la enfermedad. Así, han sido establecidos programas de control en los Estados Unidos, Cuba, Jamaica, Hungría, Francia, Alemania, Bulgaria, Noruega, Suecia, Rumania, Yugoslavia, Japón, Vietnam y México (Granoff, 1999).

Por lo tanto, es necesaria la elección de un programa de vacunación, realizando su control y seguimiento para asegurar el mantenimiento de las explotaciones bien vacunadas y el control de los factores de riesgo asociados a la circulación del virus en las poblaciones vacunadas, producirá una reducción muy significativa de la prevalencia del virus y la posibilidad de controlar y erradicar la enfermedad (Campomanes, 2000).

XI. CONCLUSIONES.



Al trabajar con dos vacunas producidas por deleción genética derivadas de las cepas Bucharest y Begonia, se logro observar que son altamente seguras y estimulan una fuerte inmunogenicidad, además de contar con las características de calidad que las hacen eficaces para su empleo en la eliminación de la Enfermedad de Aujeszky de las explotaciones infectadas.

Los resultados obtenidos en este estudio nos permiten mostrar la capacidad inmunogénica de las cepas Bucharest y Begonia gE-/TK-, protegiendo a cerdos de la edad mas susceptible a la enfermedad contra un desafío con una cepa patógena del VEA.

Los estudios de esta eficacia incluyen:

1. El uso de cerdos serológicamente negativos a la EA, provenientes de granjas libres de la enfermedad y de madres no inmunizadas, lo que evita la interferencia de la respuesta inmune debido a la presencia de anticuerpos maternos.
2. El empleo de dos cepas vacunales, Bucharest y Begonia que presentan una deleción en la región Us que afecta la presentación de la gE, con las que los animales vacunados con ellas pueden ser diferenciados de los animales infectados.
3. Dos diferentes procedimientos de vacunación, aplicando los biológicos por vías distintas (IN, IM), y observándose en ambos una respuesta adecuada frente al desafío con una cepa patógena.
4. El empleo de cerdos entre 10 y 12 semanas de edad, representando a la población más susceptibles para la presentación de la enfermedad.
5. El empleo de un modelo de desafío estandarizado, bajo condiciones controladas.

Las reacciones generales después de la aplicación de la vacuna fueron favorables en cada uno de los animales, los cuales no presentaron efectos perjudiciales en su salud, tales como presentación de signos clínicos incluyendo aumentos significativos de temperatura, y no se observo reacción en el sitio de aplicación, es importante mencionar esto ya que logran además evaluarse las propiedades de seguridad exactas de la cepa vacunal para el producto terminado al incluir adyuvantes de tipo oleoso.

Por otro lado, a pesar de no haber sido evaluado en este trabajo, se pudo observar que las vacunas con deleción genética evitan de manera notable la pérdida de peso con relación a los animales desafiados no vacunados, por lo que el desarrollo de los animales vacunados no se ve afectado al entrar en contacto con una cepa patógena.

En las pruebas realizadas pudimos comprobar que en los cerdos de 11 semanas de edad, sanos y susceptibles, no se observaron reacciones adversas inducidas por la aplicación de 10 dosis de vacuna de las cepas Bucharest y Begonia, por la ruta intranasal

e intramuscular al mismo tiempo (2ml/fosa nasal, 8ml/IM), mostrando una seroconversión comparable con los animales vacunados con una sola dosis de vacuna y corroborando la completa inocuidad que representa el empleo de las vacunas seleccionadas.

Por lo que respecta a la contagiosidad de las cepas vacunales, no se encontraron anticuerpos contra el virus en ninguno de los animales de convivencia de la prueba de cohabitación, lo que indica que el virus no fue capaz de infectar a los cerdos no vacunados. Este resultado es de gran importancia ya que al no difundirse el virus vacunal en los animales de convivencia, no habría una posible interferencia en las pruebas serológicas en las granjas a nivel de campo.

En cuanto a las pruebas de control de calidad para cada una de las vacunas, se pudo comprobar que cumplen con cada una de las especificaciones requeridas para su liberación, con esto podemos decir que las pruebas de control del proceso de manufactura verifican la consistencia del proceso de producción y el producto final.

A pesar de esto, en México las pruebas a nivel de campo son necesarias para evaluar además de la seguridad y eficacia de este tipo de vacunas, la estabilidad genética, la latencia y aislamiento del SNC o de otros tejidos de animales vacunados.

Debido a que la EA produce importantes pérdidas de lechones de cerdas no inmunizadas, es preciso evaluar la efectividad en este grupo de la población. Además la elección de un buen programa de vacunación realizando su control y seguimiento para asegurar el mantenimiento de las explotaciones bien vacunadas, y el control de los factores de riesgo asociados a la circulación del virus en las poblaciones vacunadas producirá una reducción muy significativa en la prevalencia del virus y con ello se permitirá la erradicación de la enfermedad (Arias, 2000).

XII. ANEXOS.



Tabla 1. Nomenclatura y características de la gp 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.
	gl	GE	Modula la función de diseminación.
	gX	GG	
	gp63	GI	Modula la función de diseminación.
		Gm	Penetración.

Tabla 2. Principales inmunógenos vacunales empleados en las vacunas comerciales gE-.

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

Anexo 1. Pruebas *in vivo*.

Equipo

- Chaira y cuchillo,
- Engargoladora,
- Agitador eléctrico,
- Mechero Bunsen.

Reactivos

- Alcohol al 70%.

Material

- Jeringas desechables con aguja hipodérmica 21x38,
- Gradillas,
- Tubos de vidrio de 13x100 con retapa de aluminio,
- Arete identificador,
- Frascos de vidrio de 20, 50, 100 y 300 ml,
- Marcador indeleble,
- Termómetros clínicos,
- Torundas de algodón,
- Pipetas serológicas,

Biológicos

- Para la prueba de potencia se emplean 15 cerdos susceptibles a EA de 5 – 6 semanas de edad con un peso de 10 a 12 kilogramos, clínicamente sanos y libres de anticuerpos contra la Enfermedad de Aujeszky, en una dilución final del suero 1:2 en la prueba de Seroneutralización usando 50-300 DICC_{50%} de VEA.
- Virus de la Enfermedad de Aujeszky de desafío de la cepa Becker con un título de 10⁵DICC_{50%}.
- Para la prueba de seguridad se emplean 2 cerdos susceptibles a EA de 5 – 6 semanas de edad con un peso de 10 a 12 kilogramos, clínicamente sanos y libres de anticuerpos contra la enfermedad de Aujeszky, en una dilución final del suero 1:2 en la prueba de Seroneutralización usando 50-300 DICC_{50%} de VEA.
- Para la prueba de cohabitación se emplean 2 cerdos susceptibles a EA de 5 – 6 semanas de edad con un peso de 10 a 12 kilogramos, clínicamente sanos y libres de anticuerpos contra la enfermedad de Aujeszky, en una dilución final del suero 1:2 en la prueba de Seroneutralización usando 50-300 DICC_{50%} de VEA.

Condiciones ambientales

- Área de alta seguridad
- Corraletas limpias, desinfectadas y aisladas de otras áreas,
- Alimentación de acuerdo a la etapa y a libre acceso,
- Agua limpia y fresca,
- Adecuada ventilación.

Tabla 3. Agrupación de los animales y vía de inoculación.

Vacuna 1, vía intranasal				Vacuna 2, vía intramuscular			
Vacunados	Control	Seguridad	Cohabitación	Vacunados	Control	Seguridad	Cohabitación
426	427	441	442	20	34	30	29
428	430	444	443	26	35	32	44
429	436			27	38		
432	445			28	46		
433	446			31	450		
435				45			
437				47			
438				48			
439				49			
447				50			

Anexo 2. Pruebas fisicoquímicas.

Material

- Pesafiltros,
- Pinzas metálicas,
- Espátula.

Equipo

- Lámpara de Tessler,
- Estufa de secado,
- Balanza analítica exacta para 0.1mg (rango de precisión ± 0.01 mg),
- Higrómetro,
- Jarra desecadora,
- Equipo de secado (Vacuometro) equipado con un medidor de vacío, termómetro exacto, termostato.

Biológicos.

- 0.15 a 0.20 gramos de vacuna liofilizada contra la Enfermedad de Aujeszky.
- Todos los frascos de vacuna liofilizada para prueba de vacío.

Condiciones ambientales.

- Cuarto equipado con un mecanismo capaz de mantenerlo seco y un higrómetro para asegurar una humedad relativa de 0 a 10 por ciento. El cuarto debe ser lo suficientemente grande para alojar la balanza y el horno de vacío, además de permitir el manejo adecuado de la muestra.
- Cuarto oscuro.

Anexo 3. Pruebas *in vitro*.

Vestuario y equipo de seguridad

- Bata blanca de laboratorio,
- Cubre boca,
- Cofia.

Material

- Agujas estériles,
- Aspersor con solución de desinfectante,
- Asa bacteriológica,
- Cajas petri de vidrio ó plástico estériles,
- Filtros de 25 mm de diámetro,
- Filtros de membranas de 0.45 y 0.22 micras,
- Jeringas hipodérmicas estériles de 1, 3, 5 y 10ml,
- Membranas de 0.45 y 0.22 micras,
- Micropipeta graduada,
- Pipetas serológicas estériles de 2, 5, 10 y 25ml.
- Tijeras y pinzas estériles,
- Gradilla para laminillas,
- Cámara húmeda,
- Frascos de vidrio de 50, 100 y 300ml,
- Torundas de algodón,
- Espátula pequeña y delgada,
- Tubos de vidrio de 10x,
- Gradilla para tubos de vidrio,
- Puntillas estériles,

Equipo

- Autoclave,
- Balanza granataria,
- Estufa bacteriológica de 37° y de 22°C
- Estufa bacteriológica de 37° con 4 % de CO₂
- Microscopio invertido,
- Refrigerador a 4°C,
- Bomba de vacío,
- Estufa bacteriológica,
- Agitador automático,
- Mecheros Bunsen o campana de flujo laminar.

Medios y reactivos

- Agua destilada,
- Agar noble,
- Agar nutritivo,
- Agar Saboureaud,
- Agar Mac Conkey,
- Alcohol al 70%,
- Caldo de tioglicolato,
- Caldo de soya tripticaseina,
- Caldo Saboureaud,
- Medio líquido para micoplasmas,
- Medio sólido para micoplasmas,
- Penicilina G sódica,
- Suero equino,
- Suero porcino,
- Alcohol al 70%,
- MEM (Medio mínimo esencial),
- PBS (Solución amortiguada de fosfatos),
- Bicarbonato de sodio,
- SFB (Suero Fetal Bovino) estéril,
- Medio de LE.

Biológicos.

- Vacuna de virus vivo modificado contra la Enfermedad de Aujeszky.
- 6 tubos Leighton contengan monoestrato de cultivo celular de la línea pk15 o vero.
- Conjugado fluorescente para el diagnóstico del VEA.
- 14 botellas de 5ml que contengan monoestrato de cultivo celular de la línea pk15 o vero.
- Suero hiperinmune contra el VEA.
- Suspensión de glóbulos rojos de ave o cuye al 0.5% y al 0.2%.
- Virus de referencia de la Enfermedad de Ojo Azul.
- Virus de referencia de la FPC.
- Conjugado fluorescente para el diagnóstico de la FPC.
- 6 tubos Leighton con monoestrato de la línea celular ST.
- Virus de referencia de PRRS.
- Conjugado fluorescente para el diagnóstico de PRRS.
- 6 tubos Leighton con monoestrato de la línea celular MA104.
- Virus de referencia de la DVB.
- Conjugado fluorescente para el diagnóstico de la DVB.
- 6 tubos Leighton con monoestrato de la línea celular MDBK.

- Microplaca de fondo plano de 96 pozos con monoestrato de cultivo celular de la línea pk15.

Condiciones ambientales.

- La instalación o área de trabajo debe estar aislada de las demás áreas, y no manifestará ningún riesgo de contaminación; para lo cual deberá cumplirse con un adecuado programa de control ambiental y sanitización, además no será utilizado para ninguna otra actividad.

Tabla 4. Medios, temperaturas e inóculos para la prueba de pureza.

Medio	Cantidad medio	Cantidad inóculo	37°C	22°C
Caldo tioglicolato	20ml	1ml	2 tubos	2 tubos
Control	20ml	0ml	2 tubos	2 tubos
Caldo Soya tripticaseína	20ml	1ml	1 tubo	1 tubo
Control	20ml	0ml	NO	1 tubo
Agar nutritivo	20ml	0.2ml	1 caja	NO
Control	20ml	0ml	1 caja	NO
Agar Saboureaud	20ml	0.2ml	NO	1 caja
Control	20ml	0ml	NO	1 caja
Medio Micoplasma Líquido	2ml	0.2ml	1 tubo	NO
Control	2ml	0ml	1 tubo	NO
Medio Micoplasma Sólido	7ml	0.2ml	1 caja	NO
Control	7ml	0ml	1 caja	NO

Tabla 5. ELISA Screening (monitoreo).

VACUNA 1	# Arete	DO1	DO2	PDO	S/P	Resultado
Vacunados	426	1.287	1.371	1.3290	5.3691	Positivo
	428	0.936	0.859	0.8975	3.5172	Positivo
	429	0.796	0.786	0.7910	3.0601	Positivo
	432	1.283	1.29	1.2865	5.1867	Positivo
	433	0.898	0.92	0.9090	3.5665	Positivo
	435	0.716	0.667	0.6915	2.6330	Positivo
	437	0.804	0.876	0.8400	3.2704	Positivo
	438	1.009	0.971	0.9900	3.9142	Positivo
	439	0.663	0.666	0.6645	2.5172	Positivo
	447	0.651	0.648	0.6495	-0.1223	Positivo
Controles	427	0.051	0.052	0.0515	-0.1137	Negativo
	430	0.047	0.048	0.0475	-0.1309	Negativo
	436	0.053	0.05	0.0515	-0.1137	Negativo
	445	0.051	0.048	0.0490	-0.1245	Negativo
	446	0.054	0.053	0.0535	-0.1052	Negativo
Cohabitación	442	0.053	0.049	0.0510	-0.1159	Negativo
	443	0.049	0.049	0.0490	-0.1245	Negativo
Seguridad	441	1.251	1.179	1.2150	4.8798	Positivo
	444	0.946	0.988	0.9670	3.8155	Positivo

VACUNA 2	# Arete	DO1	DO2	PDO	S/P	Resultado
Vacunados	20	1.086	0.990	1.0380	4.1202	Positivo
	26	1.057	1.010	1.0335	4.1009	Positivo
	27	0.919	0.949	0.9340	3.6738	Positivo
	28	0.788	0.916	0.8520	3.3219	Positivo
	31	1.059	0.932	0.9955	3.9378	Positivo
	45	0.987	1.004	0.9955	3.9378	Positivo
	47	0.889	0.996	0.9425	3.7103	Positivo
	48	0.938	1.079	1.0085	3.9936	Positivo
	49	1.300	1.200	1.2500	5.0300	Positivo
	50	1.230	1.088	1.1590	4.6395	Positivo
Controles	34	0.052	0.055	0.0535	-0.1052	Negativo
	35	0.054	0.054	0.0540	-0.1030	Negativo
	38	0.053	0.050	0.0515	-0.1137	Negativo
	46	0.052	0.052	0.0520	-0.1116	Negativo
	450	0.055	0.060	0.0575	-0.0880	Negativo
Cohabitación	29	0.049	0.052	0.0505	-0.1180	Negativo
	44	0.056	0.055	0.0555	-0.0966	Negativo
Seguridad	30	1.496	1.470	1.4830	6.0300	Positivo
	32	1.393	1.501	1.4470	5.8755	Positivo

DO = Densidad óptica; PDO = Promedio de la densidad óptica; S/P = Factor S/P

Tabla 6. ELISA Gp1 (diferencial).

Vacuna 1	# Arete	DO1	DO2	PDO	%Inhibición	Resultado
Vacunados	426	1.362	1.402	1.3820	5.2776	Negativo
	428	1.226	1.188	1.2070	17.2721	Negativo
	429	1.150	1.081	1.1155	23.5435	Negativo
	432	1.152	1.210	1.1810	19.0541	Negativo
	433	1.201	1.197	1.1990	17.8204	Negativo
	435	1.283	0.963	1.1230	23.0295	Negativo
	437	1.313	1.389	1.3510	7.4023	Negativo
	438	1.388	1.213	1.3005	10.8636	Negativo
	439	1.348	1.240	1.2940	11.3091	Negativo
	447	1.342	1.299	1.3205	9.4928	Negativo
Cohabitación	442	1.310	1.330	1.3200	9.5271	Negativo
	443	1.383	1.081	1.2320	15.5586	Negativo
Seguridad	441	1.219	1.188	1.2035	17.5120	Negativo
	444	1.166	1.123	1.1445	21.5559	Negativo

Vacuna 2	# Arete	DO1	DO2	PDO	%Inhibición	Resultado
Vacunados	20	1.305	1.161	1.2330	15.4901	Negativo
	26	1.151	1.183	1.1670	20.0137	Negativo
	27	1.319	1.200	1.2595	13.6737	Negativo
	28	1.316	1.237	1.2765	12.5086	Negativo
	31	1.282	1.302	1.2920	11.4462	Negativo
	45	1.239	1.193	1.2160	16.6552	Negativo
	47	1.233	1.275	1.2540	14.0507	Negativo
	48	1.158	1.295	1.2265	15.9356	Negativo
	49	1.316	1.195	1.2555	13.9479	Negativo
	50	1.319	1.360	1.3395	8.1905	Negativo
Cohabitación	29	1.292	1.220	1.2560	13.9136	Negativo
	44	1.216	1.274	1.2450	14.6676	Negativo
Seguridad	30	1.172	1.261	1.2165	16.6210	Negativo
	32	1.343	1.205	1.2740	12.6799	Negativo

Tabla 7. Registro de temperaturas de los cerdos vacunados, periodo posvacunación.

Vacuna 1																
# Arete.	02/09	03/09	04/09	05/09	06/09	09/09	10/09	11/09	12/09	13/09	16/09	17/09	18/09	19/09	20/09	
426	39.3	39.2	39.2	39.1	39.2	39.4	38.9	39.4	39.8	39.4	39.2	39.2	39.3	39.5	39.4	
428	39.2	39.1	38.9	39.0	39.0	39.2	39.4	38.9	39.1	38.9	39.3	39.0	39.2	39.1	39.0	
429	39.3	39.2	39.3	39.2	39.3	39.1	39.5	39.2	39.3	38.9	39.4	39.0	39.3	39.3	39.4	
432	39.0	39.1	39.1	39.0	39.0	39.1	39.5	39.0	39.3	39.1	39.1	39.1	39.2	39.2	39.1	
433	39.3	39.3	38.8	38.9	39.0	39.5	39.8	39.2	39.2	39.2	39.1	39.1	39.2	39.3	39.0	
435	38.9	39.0	39.0	39.2	39.4	39.3	39.0	39.5	39.3	38.9	39.3	39.1	39.2	39.1	39.0	
437	39.2	39.2	39.2	39.1	39.3	39.2	39.0	39.0	39.3	39.3	39.4	39.0	39.1	39.4	39.3	
438	39.2	39.1	39.5	39.4	39.2	39.0	39.5	39.3	39.2	39.6	39.4	39.2	39.4	39.3	39.3	
439	39.1	39.0	39.0	39.1	39.1	39.4	39.0	39.4	39.5	39.0	39.1	39.2	39.0	39.0	39.2	
447	39.0	39.0	38.9	39.9	39.2	39.0	39.4	38.9	39.0	39.2	39.0	39.0	39.1	39.2	39.1	

Vacuna 2																
#Arete.	02/09	03/09	04/09	05/09	06/09	09/09	10/09	11/09	12/09	13/09	16/09	17/09	18/09	19/09	20/09	
20	39.2	39.3	39.6	39.3	39.1	39.2	39.0	39.2	39.3	39.2	39.1	39.5	38.9	39.0	39.1	
26	39.3	39.3	39.3	39.4	39.1	39.1	39.6	39.5	39.5	39.3	39.2	39.3	39.4	38.9	39.0	
27	39.5	39.3	39.5	39.6	39.1	38.9	39.2	39.2	39.2	39.1	39.0	39.3	39.1	39.1	39.1	
28	39.0	39.0	39.1	39.2	39.4	39.4	39.3	39.2	39.1	39.5	39.3	39.3	39.2	39.2	39.1	
31	38.9	38.9	39.0	39.0	39.1	39.3	39.3	39.4	39.5	39.2	39.1	39.1	38.9	39.0	39.1	
45	39.5	39.5	39.6	39.4	39.4	39.2	39.3	39.2	39.1	38.9	38.9	39.0	39.1	39.1	39.5	
47	39.3	39.2	39.1	39.1	39.0	39.5	39.6	38.9	38.9	39.3	39.4	39.2	39.1	39.1	39.0	
48	39.3	39.3	39.2	39.2	39.2	39.2	39.4	39.7	39.6	39.5	39.2	38.9	39.0	39.1	39.4	
49	39.2	39.2	39.1	39.2	39.0	39.4	39.3	39.3	38.9	38.8	39.1	39.1	39.2	39.3	39.3	
50	39.5	39.5	39.4	39.3	39.2	39.1	39.9	39.7	39.4	39.1	39.2	39.0	39.1	39.3	39.4	

Tabla 8. Registro de temperaturas de los cerdos vacunados, periodo posdesafío.

Vacuna 1 #identificación	24/09	25/09	26/09	27/09	28/09	30/09	01/10	02/10	03/10	04/10
426	39.4	39.3	39.9	39.7	39.2	39.2	39.7	39.3	39.6	39.5
428	39.0	40.0	40.0	39.5	39.2	38.9	39.2	39.0	39.3	39.0
429	39.3	40.5	39.8	40.2	39.7	39.3	39.7	39.6	39.4	39.7
432	39.2	39.4	39.5	39.9	39.2	38.6	39.2	39.2	39.2	39.1
433	39.4	40.0	41.2	39.8	39.2	39.2	39.4	39.7	39.6	39.6
435	39.3	39.4	39.9	39.9	39.1	39.2	39.3	39.3	39.4	39.6
437	39.6	39.8	39.8	40.1	39.2	39.0	39.7	39.7	39.5	39.6
438	39.3	39.7	39.7	40.1	39.4	39.3	39.6	39.6	39.6	39.6
439	39.4	39.5	40.0	39.4	38.8	39.2	39.4	39.4	39.7	39.8
447	39.6	39.2	40.3	40.3+	40.2	39.3	39.5	39.5	39.7	39.4

Vacuna 2 #identificación	24/09	25/09	26/09	27/09	28/09	30/09	01/10	02/10	03/10	04/10
20	39.7	39.5	39.7	40.0	40.5	40.2	40.0	40.0	39.4	39.4
26	39.8	40.2	39.6	39.7	39.2	39.7	40.2	40.0	39.5	39.2
27	39.6	40.5	39.8	40.0	39.7	39.6	40.1	39.8	39.7	39.8
28	39.7	40.4	39.7	39.7	39.5	40.5+	39.5	39.6	39.8	39.7
31	39.7	39.5	39.5	39.2	39.4	40.2	39.7	39.6	39.6	39.4
45	39.6	40.7	40.2	39.7	39.6	39.7	39.6	39.6	39.7	39.7
47	40.0	40.1	38.9	39.5	39.8	39.7	39.7	39.9	39.9	39.9
48	39.7	40.5	39.8	39.5	38.9	39.4	39.5	39.7	39.4	39.7
49	39.5	40.2	39.8	39.8	39.6	39.7	39.3	39.4	39.2	39.1
50	40.0	40.6	40.0	40.1	39.5	39.2	39.5	39.7	39.6	39.6

+ = Enfermos, depresión, anorexia, temblores musculares

Tabla 9. Registro de temperaturas de los cerdos testigo, periodo posdesafío.

Vacuna 1 #identificación	24/09	25/09	26/09	27/09	28/09	30/09	01/10	02/10	03/10	04/10
427	39.0	40.3	41.0	41.1	39.8	40.1	39.4	39.6	39.1	39.3+
430	39.3	40.4	40.5	40.6	39.9	40.3	39.7	38.6	*	
436	39.2	40.7	40.8	40.8	40.5	39.9	39.4	39.2	39.0	39.1+
445	39.5	40.5	40.4	40.4	40.2	39.4	39.5	38.2	39.5	*
446	39.0	40.2	40.4	40.3	39.5	39.3	39.4	39.1	38.5	38.5+
Vacuna 2 #identificación	24/09	25/09	26/09	27/09	28/09	30/09	01/10	02/10	03/10	04/10
34	39.8	40.3	40.6	41.2	37.9	38.0	37.5	*		
35	39.5	40.0	40.4	41.0	39.5	39.0	37.5	*		
38	40.5	40.7	41.0	40.9	38.7	38.0	37.8	*		
46	39.4	40.8	40.6	40.7	38.5	*				
450	39.7	40.5	40.4	41.0	39.0	*				

* = Animales muertos, + = Animales enfermos.

Tabla 10. Registro de temperaturas de los cerdos de seguridad y cohabitación.

Vacuna 1																
Grupo	#	0209	0309	0409	0509	0609	0909	1009	1109	1209	1309	1609	1709	1809	1909	2009
Seguridad	441	40.3	40.1	39.5	39.5	39.2	39.5	39.4	39.4	39.1	39.2	39.0	39.5	39.3	39.4	39.0
	444	39.8	39.5	39.3	39.0	39.2	39.1	39.3	39.0	39.0	39.5	39.3	39.3	39.2	39.0	39.2
Cohabitación	442	39.0	39.2	39.2	39.0	39.3	39.4	39.0	39.0	39.7	39.6	39.5	39.5	39.4	39.4	39.2
	443	39.7	39.7	39.2	38.9	39.1	39.3	39.3	38.9	39.0	39.1	39.1	39.2	39.1	39.0	39.0

Vacuna 2																
Grupo	#	0209	0309	0409	0509	0609	0909	1009	1109	1209	1309	1609	1709	1809	1909	2009
Seguridad	30	39.8	40.0	39.2	39.1	38.9	39.3	39.3	39.4	39.0	39.2	39.1	39.3	39.3	39.0	39.1
	32	39.6	40.2	40.0	39.5	39.4	39.7	40.2	40.1	39.3	38.9	39.1	39.3	39.2	39.2	39.2
Cohabitación	29	39.6	39.6	39.0	39.2	39.3	39.5	38.9	39.3	39.0	39.7	39.0	39.2	39.1	39.4	39.6
	44	39.3	39.5	38.9	39.0	39.3	39.3	39.3	39.4	39.0	39.1	39.1	39.3	39.1	39.4	39.0

XIII. REFERENCIAS.



- 1) Alzima LA, Álvarez FM, Rodríguez BJ, Villegas PS, Pech HM. Seroprevalencia del virus de la enfermedad de Aujeszky en cerdos finalizados en una granja de ciclo completo en el Estado de Yucatán. México, 2000.

- 2) Arias M, Sierra MA, Sánchez-Vizcaino JM. Prevención, profilaxis, control y erradicación de la Enfermedad de Aujeszky, 2000.

- 3) Beer J. Enfermedades infecciosas de los animales domésticos. España (Zaragoza): Acribia, 1987: 299-309.

- 4) Boehringer Ingelheim Laboratories. El virus, la Enfermedad, la Inmunidad, el Diagnóstico y la Vacunación. www.boehringer-ingelheim.es/veterinaria/aujeszky. 2001.

- 5) Campomanes AC, Castro DG, Diosdado FV, Rosales CO, Morilla AG. Inmunogenicidad y contagiosidad de una vacuna de virus vivo atenuado contra la Enfermedad de Aujeszky en cerdos. Veterinaria México, 2000, 31(3): 255-257.

- 6) Code Federal of Regulations. Animal and Animal Products, part 9. National Archives and Records Administration. USA 2004, vol. 5.

- 7) Darai Gh. Virus diseases in laboratory and captive animals. Federal Republic of Germany; Martinus Nijhoff publishing. 1988: 206-217.

- 8) Diosdado VF, Castro GDA, Rosales OC, Calderón CA, Campomanes CA, Morilla GA. Inmunogenicidad de seis vacunas de virus inactivado contra la Enfermedad de Aujeszky. *Técnica Pecuaria México*, 1999, 37(1):59-62.
- 9) Dirección General de Salud Animal. Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal. Santa Ana Tecámac, Estado de México, 1999.
- 10) Edwards S, Pastoret PP. *Advances in Veterinary Virology*. Elsevier. Amsterdam, 1990; 85-101.
- 11) Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Estadística para ensayos biológicos. Sexta edición, México (DF), 1994: 146-152.
- 12) Fenner F. *Veterinary Virology*. Academic Press, INC. San Diego (California) 1987: 353-356.
- 13) Gillespie RR, Hill MA, Kanitz CL, Knox KE, Clark LK, Robinson JP. Infection of pigs by Aujeszky's disease virus via the breath of intranasally inoculated pigs. *Research in Veterinary Science*, 1999, 68 (3): 217-222.
- 14) Granoff A, Webster RG, *Encyclopedia of Virology*. Academic Press. San Diego, California, 1999; 1421-1429.

- 15) Hans P, Klaus B. Manual de las enfermedades del cerdo. México (DF): Acribia, 2000: 215-221.
- 16) IDEXX Laboratories, Inc. HerdChek. Kit de análisis para la detección de anticuerpos frente al antígeno gE del virus de la Enfermedad de Aujeszky.
- 17) Katayama S, Okada N, Yoshik K, Okabe T, Shumizu Y. Protective effect of glicoprotein gC-rich antigen against pseudorabies virus. Journal of Veterinary Medical Science. 1997, 59(8): 657-663.
- 18) Katayama S, Yoshiki K, Okada N, Kokubu T, Shimizu Y. Efficacy of a mixed glicoprotein vaccine against pseudorabies in pregnant sows. Journal of Veterinary Medical Science, 1998, 60 (1): 23-27.
- 19) Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals. Office International des Epizooties. 2004, 5th edition.
- 20) Mengeling WL, Larget KH, Volz DM, Browmeier SL. Effect of various vaccination procedures on shedding, latency and reactivation of attenuated and virulent pseudorabies virus in swine. American Journal of Veterinary Research. 1992, 53 (11).
- 21) Mohanty, Dutta. Virologia Veterinaria. México (DF); Interamericana. 1998: 203-204.

- 22) Murphy FA, Gibbs EP, Horzinek MC, Studdrt MJ. *Veterinary Virology*. Academic Press. San Diego, California, 1999; 201-220.
- 23) NOM-003-ZOO-1993. Criterios de operación de laboratorios de prueba aprobados en materia zoonosológica. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Norma Oficial Mexicana Diario Oficial de la Federación. México (DF), 28 de abril de 1994.
- 24) NOM-007-ZOO-1994. Campaña Nacional contra la Enfermedad de Aujeszky. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Norma Oficial Mexicana Diario Oficial de la Federación. México (DF), 15 de agosto de 1996.
- 25) NOM-029-ZOO-1995. Características y especificaciones para las instalaciones y equipo de los laboratorios de pruebas y/o análisis en materia zoonosológica. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Norma Oficial Mexicana Diario Oficial de la Federación. México (DF), 24 de enero 1995.
- 26) NOM-033-ZOO-1995, Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Proyecto de modificación de Norma Oficial Mexicana Diario Oficial de la Federación. México (DF), 7 de julio de 1995.
- 27) NOM-048-ZOO-1996. Requisitos mínimos para las vacunas contra la Enfermedad de Aujeszky. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Norma

Oficial Mexicana Diario Oficial de la Federación. México (DF), 6 de febrero de 1996.

28) 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 y Desarrollo Rural. Proyecto de Norma Oficial Mexicana Diario Oficial de la Federación. México (DF), 19 de abril del 2000.

29) Pensaert MB, DeSmet K, DeWaele K. Effect and duration of virulent virus excretion upon challenge of pigs vaccinated with different glycoprotein-deleted Aujeszky's disease vaccines. *Veterinary Microbiology*. 1990; 22: 107-117.

30) Prontuario de especialidades veterinarias, farmacológicas, biológicas y nutricionales. Ediciones PLM, Edición 19, México (DF); 2003.

31) Pseudorabies Vaccine. Pfizer Animal Health, 2002; www.pfizer.com.

32) Sánchez VJ. Curso de introducción a la inmunología porcina, 2002; www.inia.es/cieex.com.

33) Scientific Review. Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines. Office International des Epizooties. 1992; 158-167.

- 34) Scientific Review . Office International des Epizooties. 1998, 17(3): 641-653.
- 35) Técnicas de titulación de anticuerpos contra el virus de la enfermedad de Aujeszky empleando diluciones dobles. Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (PRONABIVE). Manual de procedimientos técnicos. 1994.
- 36) Tizard I. Inmunología Veterinaria. McGraw-Hill Interamericana. México (DF), 1989: 192-207, 226-233.
- 37) Trigo TF. Patología Sistémica Veterinaria. McGraw-Hill Interamericana. México (DF), 1998: 69-70, 240.
- 38) Vega DH. Manual de técnicas de laboratorio de practicas de inmunología y virología. 1995.
- 39) Visser N, Lütticken D. Experiences with a gl⁺/TK⁻ modified live pseudorabies virus vaccine: strain Begonia. Vaccination and control of Aujeszky's disease. JT van Oirschot Editor. 1989: 37-44.
- 40) Yokoyama N, Maeda K, Mikami T. Recombinant viral vector vaccines for the veterinary use. Journal of Veterinary Medical Science, 1997, 59 (5): 311-322.
- 41) Zuckermann FA, Mettenteiter TC, Ben-Porat T. Role of pseudorabies virus glycoproteins in immune response. Vaccination and control of Aujeszky's disease. JT van Oirschot Editor. 1989: 107-117.