



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**DETERMINACION DE ANTICUERPOS EN SUEROS PORCINOS
CONTRA EL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE AUJESZKY**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

PRESENTA:

MONICA HERNANDEZ HERNANDEZ

ASESORES: Dra. Susana E. Mendoza Elvira
Dr. Eliseo Baugmanter Hernández



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.

Agradecimientos

A mis padres:

Les doy las gracias por darme siempre ánimo para lograr las metas que me propongo, gracias por su comprensión y paciencia, por su apoyo incondicional, no tengo palabras más que sólo decir gracias y ustedes saben que yo los QUIERO MUCHO.

A mis hermanas:

Tita y Gris, que les puedo decir más gracias por creer en mí siempre y por siempre darme ánimo para seguir adelante. Aunque que nunca se los digo saben que las QUIERO MUCHO y saben que cuentan conmigo para lo que sea.

A mis abuelitos:

Chon, Chabe y Lorenza, gracias por apoyar a mi familia siempre y por supuesto por sacarnos de apuros, los quiero.

A mis primos:

Cha, Pollo, Vic, Sergio, que puedo decirles a ustedes sólo que son lo máximo, gracias por ser como son y sobretodo gracias por apoyarnos siempre que lo necesitamos. MIL GRACIAS.

A mis compañeros del Laboratorio de Virología:

Dra. Susy:

Sólo quiero decirle que muchas gracias por abrirme las puertas de su laboratorio y aceptarme, por ser tan buena persona conmigo y sobre todo por permitirme realizar este proyecto que es de gran importancia para mí con usted. Lo único que me resta decir es GRACIAS.

Dr. Eliseo:

Lo único que le puedo decir es MIL GRACIAS por su apoyo, por ser tan amable conmigo, por permitirme aprehender un poco de lo mucho que usted sabe y sobre todo por aceptarme y abrirme las puertas de su laboratorio muchas gracias.

Al Sr. Gabino le agradezco mucho su paciencia y su ayuda que me brindo, sobre todo le agradezco los buenos ratos que me hizo pasar.

Al Dr. David, durante mi estancia me dio consejos y sobre todo su amistad, gracias por apoyarme siempre.

Al Dr. Jorge mil gracias por ayudarme cuando te lo pedí, eres de las personas más amables que conozco, no se como agradecerle lo que hiciste en mi estancia en el laboratorio, sólo puedo decirte gracias.

Al Ing. Draucin Celis por su apoyo técnico

A los chicos del laboratorio: Ma. Luisa, Julieta, Karla, Nambo, Caro, Alma, Itshel, Aleyda, Sr. Angel, gracias por ayudarme y quiero que sepan que los considero a todos mis amigos.

A Angeles, te agradezco mucho no sólo por ayudarme en este proyecto tan importante para mí sino por la amistad que me brindaste en mi estancia en el laboratorio, sabes que te aprecio mucho y que cuentas conmigo.

A mis amigos de generación:

A Elvin, Moni C, Gloria, Maribel, Ma. Félix, Susana, Tona, Hortensia, Moni G, Gerardo, Itzel muchas gracias por su amistad que me brindaron en toda mi estancia, son los mejores.

Cris:

No sé como agradecerte lo buena y amable que has sido conmigo durante todos estos años, sabes que te considero mi amiga y espero que así duremos muchos pero muchos años, sabes que te aprecio mucho y que cuentas conmigo siempre.

Lili:

Gracias por brindarme tu amistad y por permitirme ser una de tus amigas.

Néstor:

Que te puedo decir, sólo que cuentas conmigo y ya sabes que te considero mi amigo.

A mis sinodales:

Por última y no menos importante, Gracias a: QFB. Azucena Lee, QFB. Juan Chiu, Dr. Víctor Zendejas, Dr. Tonatiuh Cruz, gracias a sus consejos, comentarios y sugerencias, este trabajo mejoró. Muchas Gracias.

CONTENIDO

| | Pags. |
|---|-------|
| Presentación | |
| Índice de cuadros..... | lii |
| Índice de figuras | lv |
| Índice de diagramas | lv |
| Índice de abreviaturas | v |
| | |
| 1. INTRODUCCION | 1 |
| 1.1 Antecedentes | 1 |
| 1.2 Generalidades | 2 |
| 1.3 Glicoproteínas | 3 |
| 1.4 Propiedades físico – químicas | 3 |
| 1.5 Epidemiología | 5 |
| 1.6 Formas de transmisión | 6 |
| 1.7 Patogenia | 7 |
| 1.7.1 Virulencia de la cepa | 7 |
| 1.7.2 Distribución del virus | 7 |
| 1.7.3 Replicación viral | 8 |
| 1.8 Signos clínicos | 10 |
| 1.8.1 Cerdos neonatales | 10 |
| 1.8.2 Cerdos lactantes | 11 |
| 1.8.3 Cerdos de engorde | 12 |
| 1.8.4 Cerdos adultos | 12 |
| 1.9 Anatomía patológica | 13 |
| 1.9.1 Lesiones macroscópicas | 13 |
| 1.9.2 Lesiones microscópicas | 15 |
| 1.10 Diagnóstico | 15 |
| 1.10.1 Aislamiento del virus | 16 |
| 1.10.2 Identificación del virus | 16 |
| 1.11 Control de la enfermedad | 17 |
| 1.11.1 Vacunación | 18 |
| 1.11.2 Erradicación | 18 |

| | |
|------------------------------------|----|
| 1.12. JUSTIFICACION | 20 |
| 1.13. HIPOTESIS | 21 |
| 2.0 OBJETIVOS | 22 |
| 2.1 Objetivo General | 22 |
| 2.2 Objetivos Particulares | 22 |
| 3. MATERIAL Y METODOS | 23 |
| 3.1 Material biológico | 23 |
| 3.2 Material experimental | 23 |
| 3.3 Preparación del material | 23 |
| 3.3 Metodología | 24 |
| 4. RESULTADOS | 28 |
| 5. DISCUSION | 31 |
| 6. IMPLICACIONES | 38 |
| 7. REFERENCIAS | 39 |

Índice de cuadros

| Cuadro | Pag. |
|--|------|
| 1. Características principales de las glicoproteínas esenciales y no esenciales. | 4 |
| 2. Especies receptivas de forma natural a la enfermedad de Aujeszky. | 5 |
| 3. Porcentaje de sueros positivos y negativos en donde se detectaron anticuerpos contra el virus de la enfermedad de Aujeszky en la granja de Jalisco. | 29 |
| 4. Porcentaje de sueros positivos y negativos en donde se detectaron anticuerpos contra el virus de la enfermedad de Aujeszky en la granja de Hidalgo. | 29 |
| 5. Porcentaje de sueros positivos y negativos en donde se detectaron anticuerpos contra el virus de la enfermedad de Aujeszky en la granja de Sonora. | 30 |
| 6. Porcentaje total de sueros positivos y negativos donde se encontraron anticuerpos contra el virus de Aujeszky, localizados en las granjas de Hidalgo, Jalisco y Sonora. | 30 |
| 7. Situación epizootológica de la enfermedad de Aujeszky. | 34 |

Índice de figuras

| Figura | Pag. |
|---|------|
| 1. Representación del virus de la enfermedad de Aujeszky y localización de los genes que codifican las gp. | 2 |
| 2. Replicación del virus de Aujeszky. | 9 |
| 3. Fetos abortados con distintos grados de maceración. Coloración rosada a parduzca, edema subcutáneo y desarrollo correspondiente al último tercio de gestación. | 14 |
| 4. Feto momificado de menos de 90 días de desarrollo. Aspecto deshidratado, color pardo negruzco. Foto de CISA – INIA. | 14 |

Índice de Diagramas

| Diagrama | Pag. |
|--|------|
| 1. Técnica de ELISA para el VEA en cerdos vacunados, utilizando el Kit Herd Chek para la detección de anticuerpos del virus de la Pseudorrabia o Enfermedad de Aujeszky (PRV/ADV). | 26 |

Índice de abreviaturas

| | |
|-------|---|
| VEA | Virus de la Enfermedad de Aujeszky |
| EA | Enfermedad de Aujeszky |
| PRV | Virus de la Pseudorabia |
| PR | Pseudorabia |
| OIE | Oficina Internacional de Epizootias |
| Gp | Glicoproteína |
| DNA | Acido Desoxiribonucleico |
| RNA | Acido Ribonucleico |
| IFD | Inmunofluorescencia Directa |
| SN | Seroneutralización |
| IPMA | Ensayo de inmunofluorescencia en monocapa |
| ELISA | Inmunoensayo enzimático |
| PCR | Reacción en Cadena de la Polimerasa |
| SNC | Sistema Nervioso Central |
| μl | Microlitros |

PRESENTACION

El virus de la enfermedad de Aujeszky es un importante patógeno que afecta a la población porcina causando grandes pérdidas económicas. Los programas de control y erradicación se basan en el uso de vacunas vivas o inactivadas. Por lo que este trabajo se ocupó de evaluar una vacuna atenuada determinando la presencia de anticuerpos en sueros porcinos contra el virus de la enfermedad de Aujeszky, por medio de la Técnica de ELISA.

Los sueros porcinos fueron colectados de tres granjas, los cuales son: Granja de Hidalgo, Granja de Jalisco y Granja de Sonora (esta última sólo se utilizó como control negativo ya que no estaba sometida al tratamiento con la vacuna por ser un estado libre de la enfermedad de Aujeszky).

Estos sueros fueron procesados por la técnica de ELISA, por medio del Kit Herd Chek para la detección de anticuerpos (PRV/ADV). Obteniéndose resultados de 68% de seropositividad en la granja de Jalisco e Hidalgo lo que nos indicó una buena inmunogenicidad y sólo el 32% de sueros negativos, tomándose en cuenta que Sonora se encuentra libre de la enfermedad de Aujeszky.

Llegando a la conclusión que la vacuna de virus atenuado utilizada en este estudio tuvo una buena inmunogenicidad, por lo que se recomendaría para implantar un programa de control de la Enfermedad de Aujeszky en granjas con esta vacuna o una similar.

1. INTRODUCCION

1.1 Antecedentes

La enfermedad del virus de Aujeszky (VEA ó EA) ó Pseudorabia (PR ó PRV), es una enfermedad que se describió primero en Estados Unidos en 1813 en el ganado vacuno. El ganado presentaba desde convulsiones epileptiformes y eventualmente la muerte. El término pseudorabia fue usado primero en Suiza en 1849 en el ganado vacuno porque los signos clínicos eran similares a los de la rabia (Kluge JP., *et al.* 1999). En 1902 se describió la enfermedad por primera vez en Hungría por Aladar Aujeszky en vacas, perros y gatos, y dadas las manifestaciones clínicas en estos animales de tipo nervioso, se denominó “pseudorabia” (Sánchez C., *et al.*, 2000).

En 1910 Schimiedhofer confirma que el agente que ocasiona la enfermedad es viral. Y en 1934 Sabin y Wright identifican el virus como un herpesvirus. El virus de la pseudorabia se encuentra clasificado en la Lista B de la Oficina Internacional de Epizootias (OIE), en el grupo de enfermedades que afectan varias especies animales. Se incluyen en la lista B “aquellas enfermedades transmisibles que se consideran importantes desde el punto de vista socioeconómico y/o sanitario a nivel nacional, y cuyas repercusiones en el comercio internacional de animales y productos de origen animal son considerables” (Sánchez C., *et al.*, 2000).

Dentro de las enfermedades que constituyen un problema sanitario en la industria porcina se encuentra la enfermedad de Aujeszky, la que además de provocar pérdidas económicas en las granjas, dificulta el comercio nacional e internacional del cerdo y sus productos (Castro GD., *et al.*, 2000). En la mayoría de los países donde la enfermedad es endémica (por ejemplo, Estados Unidos, Francia, Alemania, entre otros) se han implementado medidas de control y erradicación basadas en el diagnóstico serológico y en la eliminación del la PR, utilizando

diversos métodos ya establecidos incluyendo la vacunación (Thawley DG., *et al.*, 1988).

1.2 Generalidades

El virus de la enfermedad de Aujeszky está clasificado en el cuarto reporte del Comité Internacional para la Taxonomía de los Virus, dentro de la familia Herpesviridae, subfamilia Alphaherpesvirinae, género: grupo I de los Herpes Virus Suis, especie: Herpesvirus suis I (Pseudo Rabia) (Matthews R., 1982).

El VEA posee una doble cadena lineal de DNA que contiene alrededor de unos 14 500 pares de bases (Kluge JP., *et al.* 1999). El virión tienen un tamaño aproximado de 150 – 180 nm de diámetro, está formado por una nucleocápside de estructura icosaédrica, compuesta por 162 capsómeros, con un tamaño aproximado de 105 – 110 nm, rodeada de una doble envoltura lipídica, la más externa procedente de las membranas intracelulares, que contiene glicoproteínas virales. En la cápside y la envoltura se encuentra una estructura amorfa electro densa, formada por proteínas virales, denominadas tegumento (figura 1).

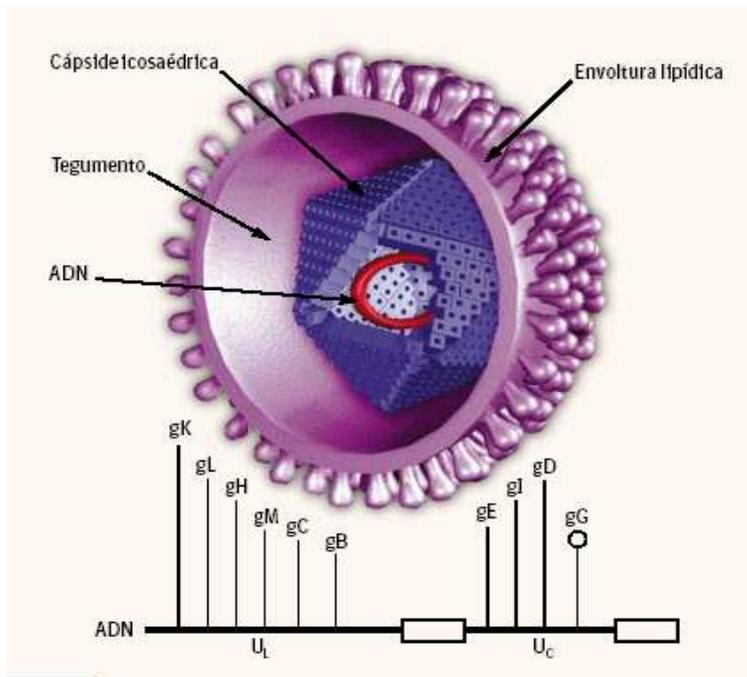


Figura 1. Representación del virus de la enfermedad de Aujeszky y localización de los genes que codifican las glicoproteínas (<http://vh2.boehringer-ingenelheim.es:8000/productos/veterinaria/aujeszky>).

1.3 Glicoproteínas

Las glicoproteínas ó proteínas víricas de membrana (gp) son los principales componentes estructurales reconocidos por el sistema inmunitario. También son mediadores importantes en la infección vírica. Estas glicoproteínas se clasifican en esenciales y no esenciales según los requerimientos del virus para crecer en cultivos celulares (Canals A., *et al.*, 2000). En el cuadro 1 se muestran las características principales de estas gp.

Todas las glicoproteínas, con la única excepción de la gG, se encuentran en la envoltura del virión. La gG se produce de forma abundante durante la infección, y se libera al medio extracelular aunque su función hasta el momento no está claramente definida (Canals A., *et al.*, 2000).

1.4 Propiedades físico – químicas

El virus de la enfermedad de Aujeszky presenta una elevada resistencia térmica, en comparación a otros de su familia. Se inactiva a 60° C en 30 a 60 minutos a 70° C en 10 – 15 minutos a 80° C en 3 minutos y a 100° C en 1 minuto (Puentes E., *et al.*, 2000).

El virus no se inactiva a pH entre 5 y 12, e incluso puede resistir de 2 a 4 horas a pH de 2 y 13.5. Aunque el tiempo de inactivación se reduce considerablemente combinando niveles altos y bajos de pH con temperaturas elevadas (Davies E B., *et al.*, 1981).

En condiciones de laboratorio se ha demostrado que el virus es inactivado luego de un tratamiento con disolventes de lípidos tales como éter, cloroformo, desoxicolato de sodio (Roizman E., *et al.*, 1963). De igual forma el tratamiento es

similar con enzimas proteolíticas como tripsina afecta la infectividad viral (Bartha A., *et al.*, 1969).

| | NOMENCLATURA | | CARACTERÍSTICAS |
|---------------|--------------|-------|---|
| | Antigua | Nueva | |
| Esenciales | gII | gB | Penetración y diseminación célula – célula y expansión neuronal. |
| | gp50 | gD | Adherencia, penetración y en diseminación intercelular. |
| | gH | gH | Penetración y diseminación célula – célula. |
| | gK | gK | Penetración y diseminación célula – célula. |
| | gL | gL | Penetración y diseminación célula – célula. |
| No Esenciales | gIII | gC | Adherencia, penetración y diseminación célula – célula. Participa en la liberación de partículas de la célula infectada y en la expansión neuronal. |
| | gI | gE | Modula la función de diseminación intercelular y en la expansión neuronal. Participa en la expansión de partículas de la célula infectada. |
| | gX | gG | |
| | gp63 | gI | Modula la función de diseminación intercelular y en la expansión de partículas.. |
| | UL10 | gM | Penetración. |

Cuadro 1. Características principales de las glicoproteínas esenciales y no esenciales (Canals A., *et al.*, 2000).

Otros productos químicos como los fenoles a temperatura ambiente, el formaldehído al 4%, metanol al 70%, hidróxido sódico al 5%, amonio cuaternario al 70%, etanol al 70% son capaces de inactivar al virus (Puentes E., *et al.*, 2000).

Las radiaciones gamma, así como la luz ultravioleta, también tienen un efecto inactivante sobre el virus de la VEA (Davies E B., *et al.*, 1981)

1.5 Epidemiología

El cerdo está considerado el reservorio natural del virus (Gustafson DP., *et al.*, 1981). En otras especies la incidencia es baja, se dan casos aislados y la enfermedad termina con la muerte del animal. El cerdo adulto es muy resistente, presentando en muchas ocasiones infecciones de tipo subclínico. Por esto, el cerdo es el único animal que actúa como reservorio de la enfermedad (Kluge JP., *et al.* 1999). En el cuadro 2 se muestran especies receptoras de forma natural al virus de PR (Gustafson DP., *et al.*, 1981).

| Animales domésticos | Animales silvestres |
|---------------------|---------------------|
| Cabra | Ciervo |
| Cerdo | Coatí |
| Conejo | Coyote |
| Gato | Jabalí |
| Oveja | Mapache |
| Perro | Rata |
| Vaca | Ratón |
| | Tejón |

Cuadro 2. Especies receptoras de forma natural Al virus de la enfermedad de Aujeszky (Gustafson DP., *et al.*, 1981).

Los cerdos infectados, excretan grandes cantidades de virus en la saliva y en las secreciones nasales, de 2 a 4 semanas después de la infección primaria, y pequeñas cantidades durante menos tiempo, una o dos semanas, de forma intermitente, a través de la orina, semen y leche (Canals A., *et al.*, 2000).

La supervivencia del virus en el medio ambiente depende de la temperatura, la humedad relativa y del medio; precisa de temperaturas invernales, inferiores a 4° C, y elevadas humedades relativas (Canals A., *et al.*, 2000).

1.6 Formas de transmisión

El cerdo es el hospedero natural y en él se manifiestan todas las formas clínicas de la enfermedad en función de la edad de los animales y del estado inmunitario de los mismos y de la explotación en general (Sánchez C., *et al.*, 2000). El mecanismo de infección es por dos formas:

- a. Transmisión directa. La mayoría de las veces, por vía oronasal o por vía genital, tanto en la monta natural como en la inseminación artificial a través del semen infectado. Existe transmisión del virus vía transplacentaria. También 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. Puede existir transmisión en la transferencia de embriones de cerdos donantes infectados en cerdas sanas (Kluge JP., *et al.*, 1999).
- b. Transmisión indirecta. Una de las más importantes es la transmisión por aire. La infección 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 agua contaminada con el VEA; a través de fómites como vehículos, botas, ropa, jeringuillas. Aunque los insectos parece que no juegan un papel importante en la transmisión del VEA, los moscos pueden actuar como vectores mecánicos del VEA entre granjas (Kluge JP., *et al.*, 1999).

1.7 Patogenia

1.7.1 Virulencia de la cepa

Existen cepas de virulencia alta, moderada y baja, y aunque todas pueden infectar al cerdo, no todas provocan síntomas clínicos. La resistencia a desarrollar síntomas clínicos se ve incrementada con la edad del animal. Cepas de baja virulencia no producen signos clínicos en animales adultos y la multiplicación vírica en estos casos se ve limitada a la puerta de entrada (Kluge JP., *et al.*, 1999).

Las cepas de alta virulencia producen una breve viremia y el virus puede estar presente en el suero y también asociado a las células blancas de la sangre. A partir de esta viremia se produce la diseminación del virus hematogena o linfática al resto del organismo (Kluge JP., *et al.*, 1999).

1.7.2 Distribución del virus

El VEA tiene tropismo por las vías respiratorias altas y el Sistema Nervioso Central (SNC). En condiciones naturales, el virus se multiplica inicialmente en el epitelio de la mucosa nasofaríngea, y/o en los órganos linfoides regionales (tonsilas y nódulos linfáticos) (Kluge JP., *et al.*, 1999).

El virus lleva a cabo su primer ciclo de replicación en la mucosa nasofaríngea y/o en los órganos linfoides regionales (tonsilas y nódulos linfáticos). A partir del sitio de replicación inicial el virus viaja, ya sea por el nervio olfatorio o los bulbos olfatorios, o bien a través del nervio glossofaríngeo o el trigémino. La ruta de migración está determinada por el sitio de replicación inicial y esto a su vez determinará el sitio del SNC a donde llegue el virus (Mc Ferran J., *et al.*, 1965).

La localización primaria del virus en encéfalo o médula no es de vital importancia ya que el virus una vez ahí se disemina rápidamente a toda la corteza cerebral. La diseminación de virus por sangre ocurre de forma irregular, y existe información que demuestra que no hay viremia, puesto que el virus no fue aislado de sangre de animales infectados (Mc Ferran J., *et al.*, 1965).

La excreción vírica se produce antes del inicio de los síntomas clínicos y cuando el curso es inaparente, comienza tras un periodo de 2 – 5 días post – infección (Kluge JP., *et al.*, 1999).

1.7.3 Replicación viral

El primer contacto entre el virus y la célula blanco se realiza por la interacción de las glicoproteínas C y D con sus respectivos receptores. La nucleocápside penetra después de que la membrana citoplasmática celular y la envoltura viral establezcan un estrecho contacto y se fusionen. Para este proceso se requiere al menos de cuatro glicoproteínas: gB, gH, gL y gD. Una vez que la nucleocápside se encuentra en el citoplasma es transportado por los microtúbulos hacia los poros de la membrana nuclear, en este momento se libera el genoma viral que penetra en el núcleo por estos poros, se circulariza y se inicia su transportación (Puentes, E, *et al.*, 2000).

La transcripción está sometida a un proceso de regulación secuencial en cascada. La replicación del DNA se realiza siguiendo un mecanismo de “círculo – rodante” que da lugar a una estructura lineal de unidades genómicas repetidas (con catómeros) que necesita ser cortada en fragmentos de genoma. Por último tiene lugar la expresión de los genes tardíos que codifican componentes de la cápside y de la envoltura. Después de la síntesis de las proteínas en el citoplasma, las proteínas de la cápside entran en el núcleo y forman la base para el ensamblaje (Puentes, E, *et al.*, 2000).

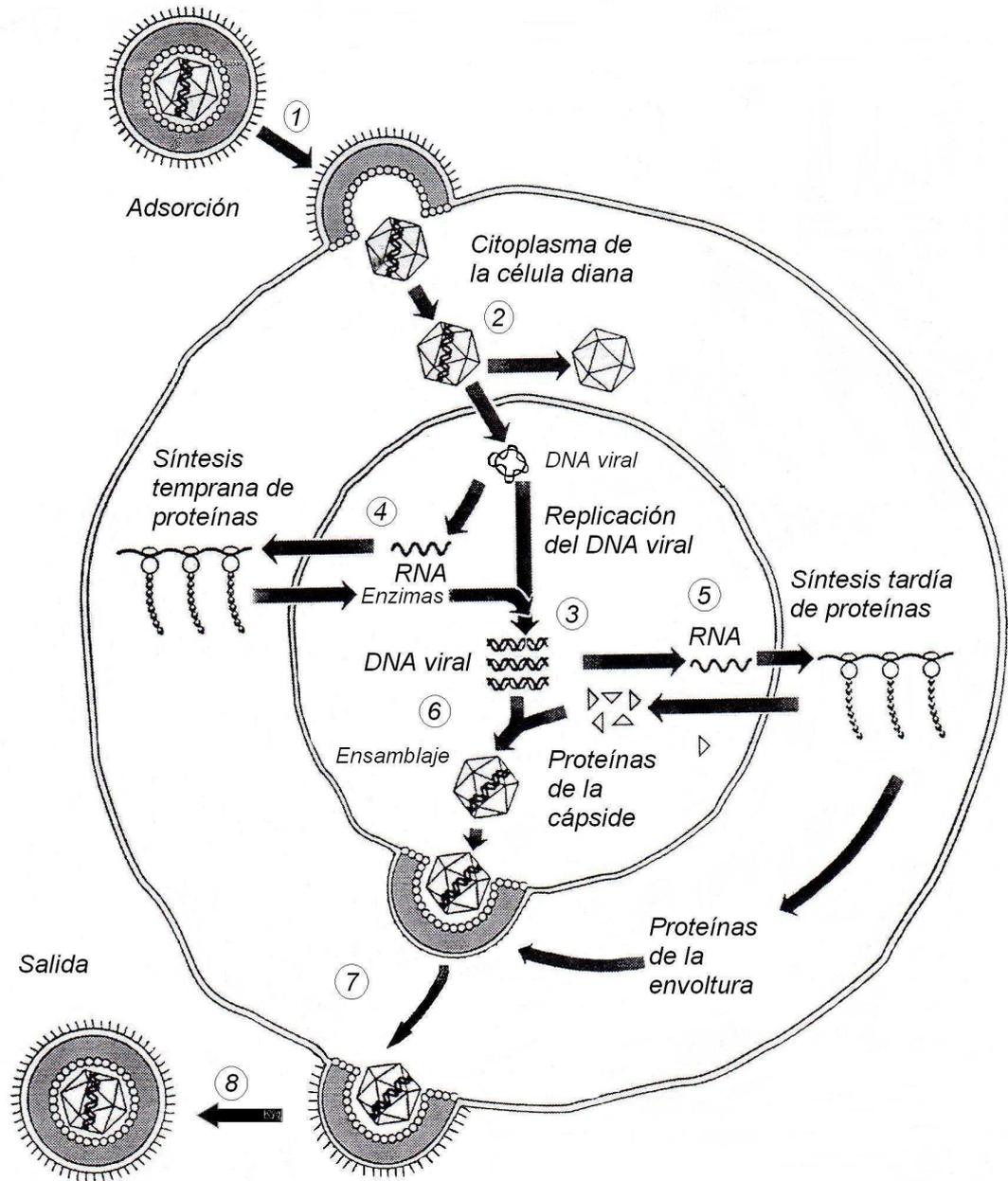


Figura 2. Replicación del virus de Aujeszky. (1) El virus penetra en la célula diana por medio de adsorción, se fusiona la envoltura del virus con la membrana de la celular, permitiendo a la nucleocápside entrar al citoplasma celular. (2) La nucleocápside es transportada a la membrana celular para allí liberar el DNA viral y este se circulariza. (3) Una vez que ingresa el DNA viral se lleva a cabo la replicación viral, aquí se lleva a cabo por medio de dos etapas: Transcripción temprana y Transcripción tardía. (4) Transcripción temprana, esta se realiza para obtener enzimas que ayudan a la replicación del DNA viral. (5) Transcripción tardía, nos da proteínas para la formación de la cápside y componentes de la envoltura. (6) Dentro del núcleo se lleva a cabo el ensamblaje del virus. (7) Las cápsidas completas dejan el núcleo por medio de gemación, aquí adquiere la primera envoltura viral. (8) Ya en el citoplasma se fusiona la primera envoltura del virus con la membrana citoplasmática, permitiendo así la salida del virus.

Las cápsidas completas dejan el núcleo por gemación a través de la membrana nuclear interna donde adquieren la primera envoltura viral. Estas partículas penetran al aparato de Golgi envuelta en una vesícula que alcanza la membrana citoplasmática y se fusiona con ella, permitiendo a la partícula viral alcanzar el exterior celular (Puentes E., *et al.*, 2000). Figura 2.

1.8 Signos clínicos

La aparición de los síntomas clínicos asociados a la enfermedad de Aujeszky en el cerdo dependen de cuatro factores principales:

- Virulencia de la cepa infectante.
- Dosis infectiva.
- Edad de los animales infectados.
- Vía de infección (Kluge JP., *et al.*, 1999).

El VEA tiene tropismo por los tejidos respiratorios y nerviosos. Generalmente los signos nerviosos se observan en animales muy jóvenes mientras que en 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 (Kluge JP., *et al.*, 1999).

1.8.1 Cerdos neonatales.

Entre los 2 y 4 meses de edad los cerdos están en una etapa intermedia en la cual las manifestaciones clínicas de la enfermedad son más claras que en los adultos (Iglesias G., 1987).

Cuando los animales se infectan por vía intrauterina y nacen vivos, estos se mueren en los dos primeros días (Kluge JP., *et al.*, 1999).

El período de incubación en estos animales es muy corto de 2 a 4 días. El cuadro clínico se inicia con fiebre (41° C), ptialismo, anorexia, apatía y vómitos. Durante las 24 horas siguientes al inicio del proceso, algunos lechones desarrollan signos nerviosos que se caracterizan por un agravamiento progresivo: desde temblores musculares, hipersalivación, incoordinación, ataxia y nistagmos, a 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% (Kluge JP., *et al.*, 1999).

Estos síntomas no se observan cuando los lechones poseen una buena inmunidad calostrual pudiendo sufrir una infección subclínica (Kluge JP., *et al.*, 1999).

1.8.2 Cerdos lactantes.

Este grupo es el que presenta el índice más alto de mortalidad, especialmente en los casos de animales totalmente susceptibles a la enfermedad. Existen variaciones en los índices de morbilidad y mortalidad determinadas por la presencia de elementos de protección de origen materno en los lechones (Kluge JP., *et al.*, 1999).

Los síntomas clínicos que sufren estos animales son muy parecidos a los de los recién nacidos; sin embargo, en este caso no son tan graves, aunque un reducido número de animales puede presentar signos nerviosos que finalizan en coma y muerte. El periodo de incubación es de 3 – 6 días, tras los cuales los animales de mayor edad 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 pérdidas de peso. La duración de los síntomas clínicos suelen ser de 5 – 10 días (Kluge JP., *et al.*, 1999).

Los cerdos que desarrollan la infección viral en el SNC mueren, sin embargo, los cerdos que sufren la infección viral respiratoria pueden desarrollar infecciones bacterianas secundarias, con: *Pasteurella multocida* ó *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Kluge JP., *et al.*, 1999).

1.8.3 Cerdos de engorde.

La morbilidad en estos casos es muy alta, casi del 100% y la mortalidad (1 – 2%) suele ser debida a complicaciones. Los signos nerviosos sólo aparecen esporádicamente produciendo temblores musculares y convulsiones violentas (Kluge JP., *et al.*, 1999).

Los signos más notables son fiebre, constipación, vómito, apatía y signos respiratorios algunos animales llegan a la parálisis incluso a la muerte (Iglesias G., 1987).

1.8.4 Cerdos adultos.

El cerdo enfermo que desarrollan los animales adultos no suelen ser graves y la mortalidad raramente es superior al 2%. Los síntomas que aparecen con mayor frecuencia son fiebre, inapetencia y problemas respiratorios leves (Kluge JP., *et al.*, 1999).

Existe 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 durante el segundo a tercer mes suelen existir

abortos, momificaciones o nacimiento de animales muy débiles. Si la infección de las hembras se produce al final de la gestación los lechones pueden nacer infectados en este caso mueren el primer o segundo día de vida (Kluge JP., *et al.*, 1999).

1.9 Anatomía patológica

1.9.1 Lesiones macroscópicas

El examen post – mortem puede revelar lesiones, tanto en el sitio de replicación inicial del virus como en los tejidos afectados por la diseminación del virus; sin embargo, se encontró que en algunos animales que murieron de la enfermedad, las lesiones aparentes fueron escasas y de difícil evaluación. En general, los animales jóvenes lactantes o recién destetados presentan lesiones más claras que los animales adultos (Gustafson D. P., 1981).

Atendiendo a las lesiones por órganos y sistemas cabe destacar en las vías respiratorias superiores la inflamación serosa o fibrinonecrótica de la mucosa nasal que puede extenderse a la faringe y a la tráquea y la tonsilitis necrótica, acompañándose de tumefacción y hemorragia de los ganglios linfáticos de la cavidad oral y de las vías respiratorias altas (Narita., *et al.*, 1984). Cuando aparecen, en el pulmón las lesiones halladas pueden variar desde congestión y edema hasta necrosis con hemorragias y la neumonía (Gustafson D. P., 1981).

En cerdos muy jóvenes sin inmunidad activa ni pasiva frente a la enfermedad, en el hígado y en el bazo se pueden observar focos blanquecinos de necrosis, superficiales de 2 a 3 mm de diámetro. También se ha descrito la enteritis necrótica en el yeyuno Terminal y en el ileon en cerdos en ese grupo de edad (Narita, *et al.*, 1984).

Las hembras reproductoras que han abortado pueden presentarse metritis moderada, con placentitis necrótica. Hay una gran variedad de presentaciones de los fetos abortados, dependiendo también del momento de la infección, como fetos frescos nacidos a término de color y consistencia normales, marcados con coloración marrón – parduzca que están edematosos y blandos al tacto, y por último momificados de color marrón oscuro o negro con aspecto seco y deshidratado, y generalmente en un grado de desarrollo inferior al del resto de los fetos producto de la misma gestación (figura 3 y 4). Dentro de la misma camada pueden nacer cerdos normales y sanos y otros débiles o que incluso mueren al nacer. En los fetos neonatos infectados se pueden encontrar focos necróticos en pulmones y tonsilas (Gustafson D. P., 1981).



Fig. 3. Fetos abortados con distintos grados de maceración. Coloración rosada a parduzca, edema subcutáneo y desarrollo correspondiente al último tercio de gestación. Foto de CISA – INIA (Sánchez MA., et al., 2000).



Fig. 4. Fetos abortados. Foto de CISA – INIA (Sánchez MA., et al., 2000).

1.9.2 Lesiones microscópicas

En cuanto a las lesiones microscópicas, en órganos del aparato respiratorio superior, se observan focos de necrosis con grados variables de destrucción de las mucosas nasal y faríngea. Hay infiltración de células inflamatorias y en algunas células afectadas se observan cuerpos de inclusión (CI) (Esontos L., *et al.*, 1966: Corner A. H., 1965); que son comunes en las células del epitelio escamoso estratificado de las criptas tonsilares (Narita M., *et al.*, 1984). Quizá las lesiones microscópicas más comúnmente observadas son aquellas que ocurren en el sistema nervioso central, que son de tipo meningoencefalitis no supurativa con destrucción de neuronas, así como microgliosis focal y difusa que afecta principalmente la materia gris de la corteza cerebral y cerebelar. Los sitios ideales para la búsqueda de lesiones son la región dorsal del tallo encefálico cerca del acueducto cerebral y los ventrículos (Dow C., *et al.*, 1962).

Los cuerpos de inclusión eosinofílicos o ligeramente basofílicos, pueden encontrarse en neuronas, astrocitos, células de la oligodendroglia y ocasionalmente en células de Purkinje en el cerebelo. Estos cuerpos de inclusión son un elemento importante para la diferenciación del padecimiento de otras encefalitis, pero no son un hallazgo constante (Done J., 1657).

1.10 Diagnóstico

El diagnóstico inicial se desprende del cuadro clínico observado en la población afectada, considerando los signos que se presentan en los animales de acuerdo a su edad (Iglesias G., 1987).

El diagnóstico del laboratorio está basado en el aislamiento e identificación del virus, mediante la detección de los antígenos virales, de ácido nucleico y en la detección de anticuerpos específicos (Echeverría M. G. y Noretta E. G., 2000)

1.10.1 Aislamiento del virus

Se realiza por medio de órganos, los más apropiados son: cerebro (principalmente cerebelo, bulbo olfatorio, médula oblonga y tronco encefálico), los segmentos cervicales y torácicos de la médula espinal, ganglio trigémino, bazo, amígdalas y pulmón procedentes de animales que muestren signos clínicos de la enfermedad. Esto nos sirve para realizar suspensiones de los órganos en cultivos celulares, donde produce un efecto citopático (Romero I. J., *et al.*, 2000)

1.10.2 Identificación del virus

La identificación se lleva a cabo por medio de:

a. Detección de antígenos virales:

- *Inmunofluorescencia Directa (IFD)*, se realiza a partir de cortes o improntas de tejido de animales sospechosos (Allan G. M., *et al.*, 1984).
- *Inmunohistoquímica*, en sus modalidades directa o indirecta (Allan G. M., *et al.*, 1985 y Afschar *et al.*, 1986).
- *Ensayo de inmunofluorescencia en monocapa (IPMA)*, esta técnica es por medio de un cultivo celular que se fija en una microplaca y se realiza una reacción inmunoenzimática con suero específico (Foix A., *et al.*, 1995).

b. Detección del ácido nucleico, se puede realizar por medio de la técnica de *Hibridación molecular* (Falser N., *et al.*, 1986).

c. Detección molecular, por medio de la *Reacción en Cadena de la Polimerasa* (PCR) (Romero I. J., *et al.*, 2000).

d. Detección de anticuerpos:

- *Seroneutralización (SN)*, se requiere de 48 horas para su realización. Se puede utilizar una gran variedad de líneas celulares como son: PK – 15, SK – 6, también pueden ser susceptibles, MDBK, VERO ó BHK – 21(Todd D., *et al.*, 1981).
- *Inmunodifusión en gel*, esta prueba se considera ideal para detectar animales positivos en una población ya que es más fácil y menos costosa que la anterior; el inconveniente es que tiene una menor sensibilidad y no proporciona títulos (Gutekunst D. E., *et al.*, 1978).
- *Agglutinación en látex*, esta técnica es sencilla y rápida ya que se obtienen resultados en 10 minutos (Romero I. J., *et al.*, 2000).
- *Inmunoensayo enzimático (ELISA)*, posee alta sensibilidad y permite realizar en pocas horas estudios sobre un gran número de animales, se han desarrollado diferentes métodos de ELISA, de tipo indirecto, de bloqueo o competitivo (Banks M., *et al.*, 1983 y Briaire J. R., 1979).

1.11 Control de la enfermedad

Cuando la granja o la región se encuentran libres de la enfermedad la mejor medida de control es evitar la entrada del agente causal. Para zonas o granjas donde la enfermedad es endémica, las medidas de control son vacunación o erradicación, para llevar a cabo esto se debe tomar en cuenta: los porcentajes de reactores positivos, finalidad de las explotaciones, fuente original de infección, posibilidades reales de eliminación gradual de portadores (Smith P. C. y Mengelin W., 1977).

1.11.1 Vacunación

El objetivo de la vacunación contra la enfermedad de Aujeszky es prevenir la aparición de sintomatología clínica en animales expuestos a virus salvaje, reducir la excreción viral y eliminar y/o reducir el establecimiento de la infección latente (Puentes E., *et al.*, 1996).

La vacuna incrementa la resistencia de los animales a la infección y reduce la excreción de virus cuando se infectan, por lo que ayuda a evitar que se reactive el virus y sean fuente de infección en la granja (Pensoert MB, *et al.*, 1990; Vannier P., 1991).

Las vacunas disponibles en forma comercial se dividen en dos grupos los cuales son:

- Virus inactivado, son inactivados por métodos químicos o físicos (Iglesias G., 1987).
- Virus atenuados, en estas nos vamos a enfocar más puesto que los animales fueron vacunados con una vacuna de este tipo. Estas vacunas son capaces de establecer una infección latente y hoy en día es claro que las características genéticas de la cepa vacunal influyen en el modo de establecimiento y en su potencial de reactivación del estado latente (Puentes E., *et al.*, 2000). Estas vacunas pueden ser desarrolladas de diferentes formas: Vacunas de delección, vacuna de recombinantes vivos, vacunas de DNA (Puentes E., *et al.*, 2000).

1.11.2 Erradicación

La forma más conocida de erradicar la enfermedad es eliminando a todos los animales de granjas infectadas y esto puede ser aplicado a nivel nacional, regional o de granja (Iglesias G., 1987).

Otro método que permite salvar animales genéticamente valiosos, es el llamado "Aislamiento de Camadas", que se basa en pasar a las camadas nacidas de cerdas positivas a instalaciones limpias de la enfermedad, se mantienen las camadas en grupos separados y realizan pruebas serológicas que determinen si los animales son realmente libres, si lo son permanecen los animales en la granja, si no los eliminan (Thawley D. G., *et al*, 1982).

1. 12. JUSTIFICACION

La enfermedad de Aujeszky es una enfermedad contagiosa de etiología vírica, que afecta a gran número de especies, fundamentalmente a la porcina y que actualmente se encuentra ampliamente distribuida, causando importantes pérdidas económicas en las explotaciones que se deben, fundamentalmente a la reducción del tamaño de la camada, abortos y crecimiento lento de los animales.

Pero ante todo la enfermedad de Aujeszky es en estos momentos una de las mayores trabas para el comercio intracomunitario de animales vivos de la especie porcina. Actuando como una barrera arancelaria.

Es por ello que los países deben aplicar planes de erradicación de esta enfermedad y políticas de vacunación previas para su control. La erradicación de la enfermedad de Aujeszky constituye una de las bases esenciales para el futuro del sector porcino, ya que ello permitirá acceder a los mercados sin ninguna dificultad, al mismo tiempo que incrementará la productividad ganadera y por tanto la mejora del nivel de vida de los ganaderos.

Por lo que en este trabajo se evaluó una vacuna atenuada con delección gE negativa para utilizarla en el control de la enfermedad de Aujeszky. Ya que este tipo de vacunas sólo necesitan una sola dosis para que se desarrolle la respuesta inmunitaria y el efecto que producen es permanente.

1. 13. HIPOTESIS

La forma más eficaz de controlar la difusión del virus de la enfermedad de Aujeszky es vacunar al ganado porcino con un biológico atenuado comprobando así la inmunogenicidad de dicha vacuna por medio de la prueba de ELISA.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

- Determinar la presencia de anticuerpos en sueros porcinos contra el virus de la enfermedad de Aujeszky en animales vacunados con un biológico atenuado.

2.2 Objetivos Particulares:

- Determinar la presencia de anticuerpos del virus de la enfermedad de Aujeszky en cerdos vacunados con un biológico atenuado por medio de la prueba de ELISA.
- Evaluar la eficiencia de una vacuna atenuada utilizada en dos granjas de la República Mexicana por medio de la prueba de ELISA.
- Evaluar la respuesta inmune humoral del ganado porcino que ha sido vacunado con un biológico atenuado.

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1 Material

a. *Biológico*. Se utilizaron 451 sueros porcinos proporcionados por el Dr. Francisco Rosales Gerente General de Intervet México. Los cuales provienen de 2 granjas de la República Mexicana* (Hidalgo y Jalisco). Estos sueros son de cerdos vacunados (una sola dosis) y se analizarán por medio de la prueba de ELISA Competitiva. Y otra granja en la cual ya se encuentra erradicada la enfermedad y se usó como control negativo utilizando la misma técnica. La cantidad de sueros en cada granja se muestra a continuación:

- Granja de Hidalgo → 159 sueros provenientes de cerdos vacunados.
- Granja de Jalisco → 200 sueros provenientes de cerdos vacunados.
- Granja de Sonora → 92 sueros se utilizó como testigo negativo.

b. *Experimental*. Se utilizó el Kit Herd Chek para la detección de anticuerpos del virus de la Pseudorrabia o Enfermedad de Aujeszky (PRV/ADV).

3.2 Preparación del material

a. *Preparación de las muestras*: Sacar los sueros del congelador y dejarlos descongelar a temperatura ambiente (aproximadamente 25° C) antes de utilizarlos, una vez ya utilizados se regresan al congelador. Identificarlos en una bitácora e ir viendo el orden en el que se colocó en la placa.

* Cuando se llevó a cabo el estudio sólo se tenían los resultados de los animales vacunados de ambas granjas de ese momento (Julio 2006); sin embargo, sería conveniente tener una muestra de los animales antes del tratamiento, para ver si la respuesta inmunitaria que estaban presentando era por la vacunación o porque ya habían estado expuestos al VEA.

- b. *Preparación de material:* Preparar los reactivos, antes de utilizarlos como lo indique el proveedor. Tener una tina con agua con cloro (concentración 3%) para ir agregando las puntillas que se utilicen. Tener pipetas y puntillas (las que sean necesarias) limpias y perfectamente secas, al igual que preparar las micropipetas que se van a utilizar.

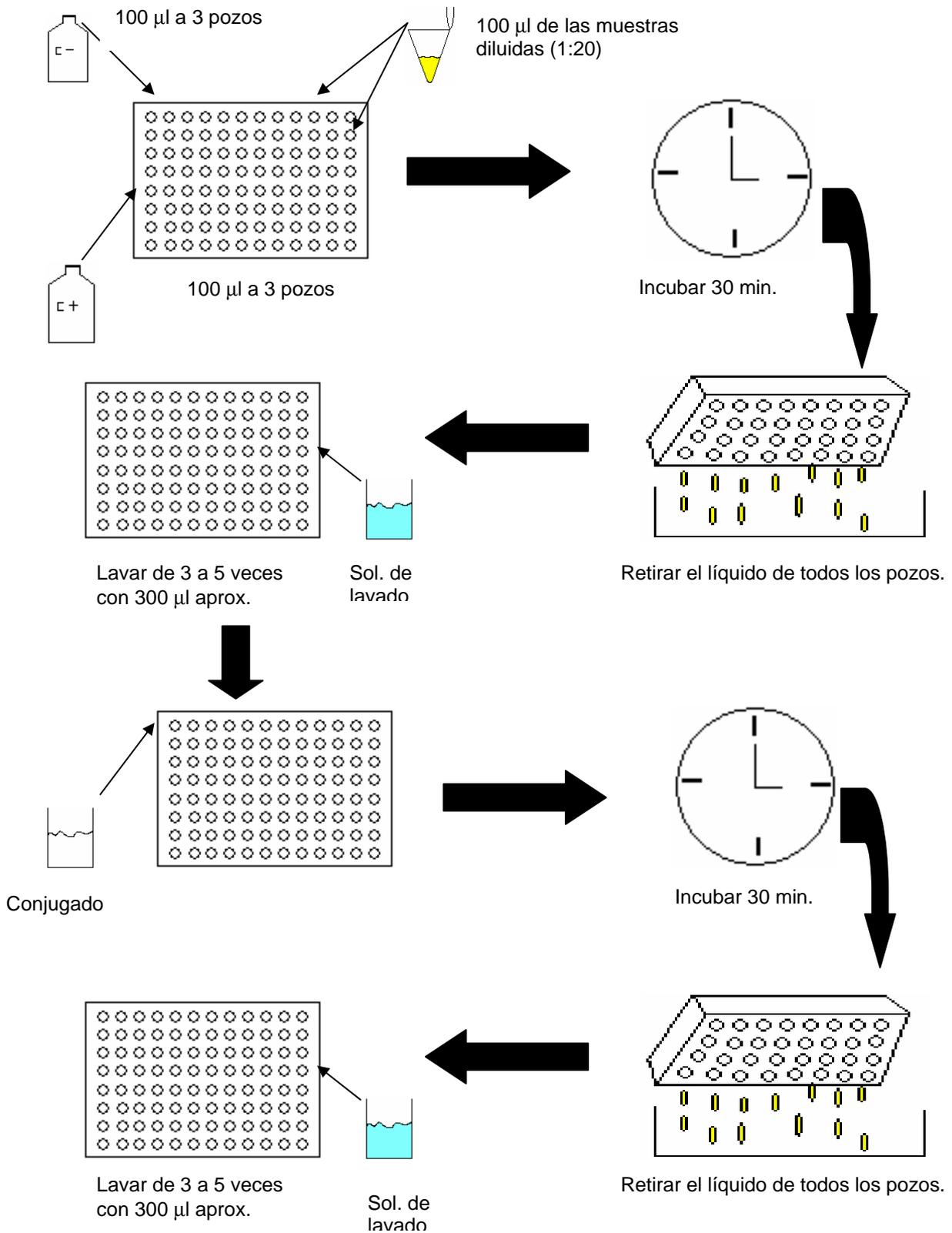
3.3 Metodología

Para la realización de la prueba se siguieron las indicaciones del laboratorio productor. En el diagrama 1, se muestra la técnica de forma resumida. La técnica completa según las instrucciones del productor es:

- a. Obtener la (s) placa (s) adsorbida con antígeno y anotar la posición de la muestra en una hoja de trabajo.
- b. Verter 100 µl de testigo negativo “no diluido” en los pozos A1, A2 y A3.
- c. Verter 100 µl de testigo positivo “no diluido” en los pozos A4, A5 y A6.
- d. Verter 100 µl de la muestra diluida (1:20 con el diluyente para la muestra antes de efectuar el análisis) en los pozos correspondientes. Todas las muestras deben realizarse por duplicado.
- e. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
- f. Aspirar el líquido de todos los pozos y desecharlos en un recipiente adecuado.
- g. Lavar cada pozo 3 o 5 veces con unos 300 µl de solución de lavado amortiguadora de fosfatos (El concentrado de lavado debe diluirse 1:10 con agua destilada o desionizada antes de usarse). Aspirar el líquido de todos los pozos después de cada lavado. Evitando que se seque la placa entre los lavados y antes de añadir el conjugado. Después de aspirar el líquido del lavado final, golpee la placa suave pero firmemente para transferir el líquido residual al material absorbente.

- h. Verter 100 μ l de conjugado antiporcino: peroxidasa de rábano en cada pozo.
- i. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
- j. Repetir los paso f y g.
- k. Verter 100 μ l de la solución de substrato TMB en cada pozo de las placas de prueba.
- l. Incubar 15 minutos a temperatura ambiente.
- m. Verter 100 μ l de la Solución de interrupción en cada pozo.
- n. Hacer el blanco en el espectrofotómetro con aire El espectrofotómetro utilizado en el laboratorio fue Hyperion MicroReader 4 Plus.
- o. Medir y anotar los valores a absorbancia de 650 nm.
- p. Calcular los resultados.

Técnica de ELISA para detectar anticuerpos contra el virus de la Enfermedad de Aujeszky.



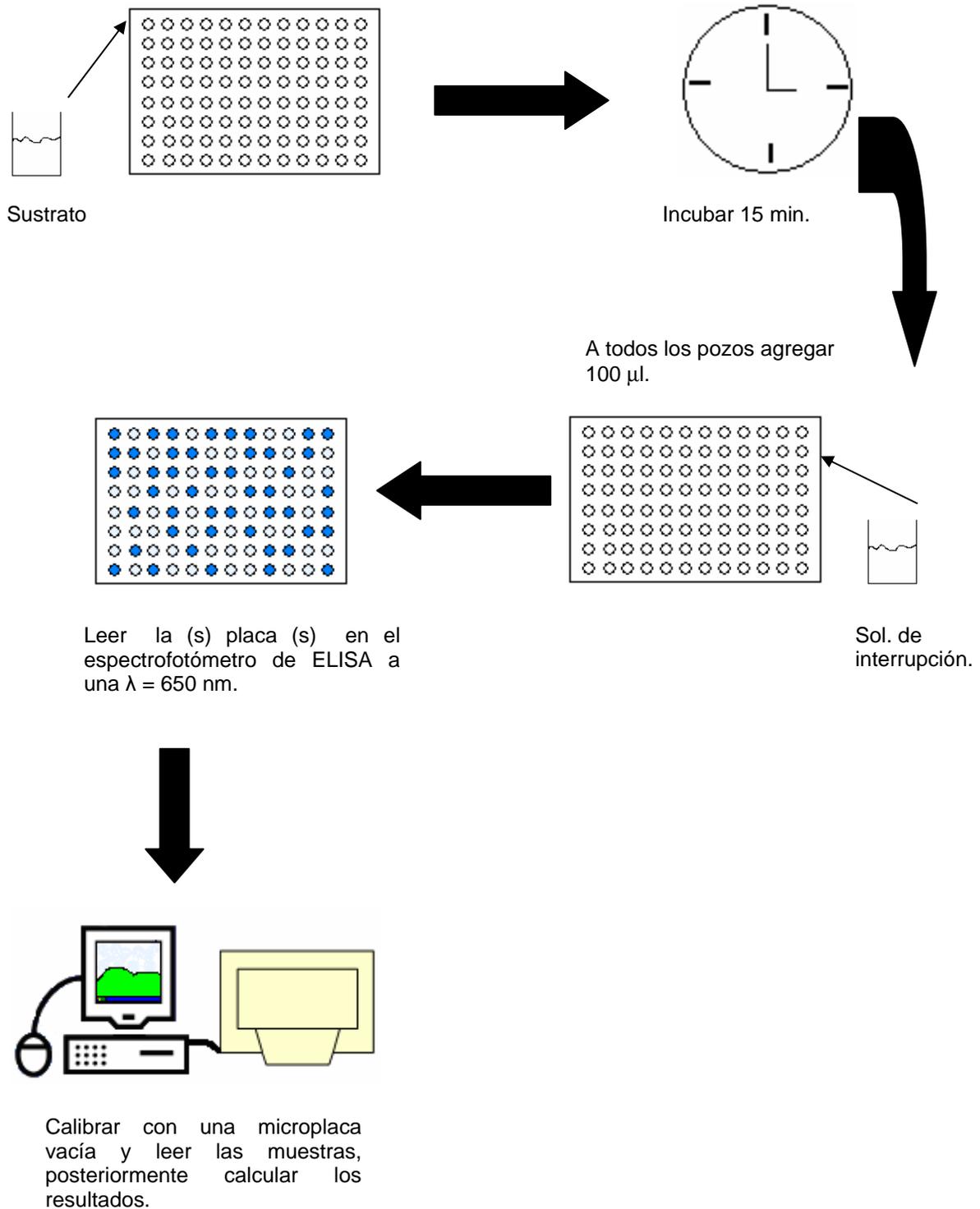


Diagrama 1. Técnica de ELISA para el VEA, utilizando el Kit Herd Chek para la detección de anticuerpos del virus de la Pseudorabia o Enfermedad de Aujeszky (PRV/ADV).

4. RESULTADOS

La clasificación de los sueros negativos y/o positivos fue determinada cuantitativamente al calcular el cociente de muestra con respecto al control positivo (S/P) para cada muestra, usando:

$$\frac{S}{P} = \frac{AM - NC\bar{x}}{PC\bar{x} - NC\bar{x}}$$

Donde AM es la absorbancia de la muestra, $NC\bar{x}$ es el promedio de los controles negativos, $PC\bar{x}$ es el promedio de los controles positivos.

El resultado fue interpretado, si el cociente S/P es menor que 0.4, la muestra es negativa y si es mayor o igual a 0.4 la muestra es positiva a los anticuerpos del virus de la enfermedad de Aujeszky.

Para la realización del análisis de cada granja lo que se hizo fue sacar el porcentaje por lote de cada granja, así como el porcentaje total de sueros positivos y de sueros negativos, de todas las granjas.

En el cuadro 3, podemos ver que en la granja de Jalisco el 83.5% de los sueros son positivos y que sólo un 16.5% son negativos.

En el cuadro 4, observamos que en la granja de Hidalgo el 94% de los sueros se detectaron anticuerpos contra el virus de Aujeszky y que sólo el 6% no presentaron.

| Lote | Sueros | | Porcentajes (%) | |
|-------|-----------|-----------|-----------------|-----------|
| | Positivos | Negativos | Positivos | Negativos |
| 1 | 30 | 1 | 96.7 | 32.3 |
| 2 | 19 | 11 | 63.3 | 26.7 |
| 3 | 27 | 13 | 67.5 | 32.5 |
| 4 | 35 | 5 | 87.5 | 12.5 |
| 5 | 27 | 2 | 93.1 | 6.4 |
| 6 | 29 | 1 | 96.6 | 3.4 |
| Total | 163 | 33 | 83.5 | 16.5 |

Cuadro 3. Porcentaje de sueros positivos y negativos en donde se detectaron anticuerpos contra el virus de la enfermedad de Aujeszky en la granja de Jalisco.

| Lote | Sueros | | Porcentajes (%) | |
|-------|-----------|-----------|-----------------|-----------|
| | Positivos | Negativos | Positivos | Negativos |
| 1 | 38 | 2 | 95.0 | 5 |
| 2 | 37 | 3 | 92.5 | 7.5 |
| 3 | 39 | 1 | 97.5 | 2.5 |
| 4 | 26 | 13 | 66.6 | 33.4 |
| Total | 140 | 19 | 94 | 6 |

Cuadro 4. Porcentaje de sueros positivos y negativos en donde se detectaron anticuerpos contra el virus de la enfermedad de Aujeszky en la granja de Hidalgo.

En el cuadro 5, no hubo presencia de anticuerpos contra el virus de Aujeszky y esto se debe a que los sueros provenientes de estos animales no fueron expuestos al virus, es decir, no están vacunados.

| Lote | Sueros | | Porcentajes (%) | |
|-------|-----------|-----------|-----------------|-----------|
| | Positivos | Negativos | Positivos | Negativos |
| 1 | 0 | 47 | 0 | 100 |
| 2 | 0 | 45 | 0 | 100 |
| Total | 0 | 92 | 0 | 100 |

Cuadro 5. Porcentaje de sueros positivos y negativos en donde se detectaron anticuerpos contra el virus de la enfermedad de Aujeszky en la granja de Sonora.

El cuadro 6 muestra el porcentaje total de sueros positivos y sueros negativos en todas las granjas. Viendo así que el 68% son sueros positivos eso quiere decir que si hubo presencia de anticuerpos contra el VEA.

| Granja | Sueros totales | Sueros positivos | Sueros negativos |
|---------|----------------|------------------|------------------|
| Hidalgo | 159 | 140 | 19 |
| Jalisco | 200 | 167 | 33 |
| Sonora | 92 | 0 | 92 |
| Total | 451 | 68% | 32% |

Cuadro 6. Porcentaje total de sueros positivos y negativos donde se encontraron anticuerpos contra el virus de Aujeszky, localizados en las granjas de Hidalgo, Jalisco y Sonora.

5. DISCUSION

La circulación viral en granjas infectadas es un proceso dinámico (Oirchot JT.,1989). Si se encuentran animales seropositivos al virus de campo nos indica una infección. Seroconversión en cerdos finalizados nos indica que el virus de la enfermedad de Aujeszky esta circulando dentro de la granja (Nauwyncy HJ., *et al.*, 1994).

La importancia de la población de cerdos finalizados en granjas seropositivas radica en que estos animales son el principal reservorio para la perpetuación de la infección y responsables de la diseminación del virus dentro de la granja (Nauwyncy HJ., *et al.*, 1994; Kimman TG., 1994). El bajo nivel de inmunidad en cerdos finalizados los hace un grupo susceptible y causante de la circulación del virus en granjas infectadas. Sin embargo, en esta población la enfermedad se presenta en forma subclínica y/o con signos respiratorios de intensidad variable (Van Oirchot JT.,1989).

Se ha demostrado ampliamente que los animales vacunados necesitan mayor cantidad de virus para ser infectados así como los animales vacunados que han sido infectados eliminan menor cantidad de virus que los no vacunados. En definitiva, las vacunaciones reducen claramente la probabilidad de transmitir la enfermedad (Sánchez JM., 1997).

Para el control y erradicación de la Enfermedad de Aujeszky se utilizan vacunas de delección genómica, que además de proveer inmunidad a los cerdos, permite la diferenciación entre los animales vacunados y los infectados con virus de campo. En México, sólo se han utilizado vacunas inactivadas; sin embargo, internacionalmente se utilizan las vacunas elaboradas con virus atenuado, debido a que estimulan la inmunidad de tipo humoral y la celular, por este motivo cuando se han utilizado en regiones donde hay elevada prevalencia, se elimina la

Enfermedad de Aujeszky con mayor rapidez que con vacunas inactivadas (Castro D. A., *et al.*, 2000)

Las vacunas producidas en México son: Aujy Plus G1. Auyesyva 6 – S, Ingelvac® Aujeszky KV, Panky – Vac®, Porcilis® Aujeszky, PR – Vac® Killed, todas estas vacunas son inactivadas (todas estas vacunas inactivadas se producen haciendo crecer a los virus en los medios de cultivo celulares adecuados, y posteriormente se inactivan con calor y/o sustancias químicas, por lo general formalina) se aplica una primera vacuna y en un periodo de 3 a 6 semanas se recomienda una revacunación ya que la respuesta inmunitaria se desarrolla después de la segunda o tercera dosis (PLM, 2001 – 2002)..

Según la NOM – 007 – ZOO – 1994, dice que todas las vacunas utilizadas en México serán de selección GI y aplicadas de acuerdo a la vía de administración indicada por el laboratorio fabricante. La vía de administración también es importante ya que observaciones clínicas indican que en los cerdos el nivel de protección tiende a ser mejor con una vacuna administrada por vía intramuscular (IM) que una intranasal (IN) (Thacker B., *et al.*, 1996).

Los resultados de este estudio mostraron que los cerdos de las granjas de Jalisco e Hidalgo desarrollaron una buena respuesta inmunitaria a la vacunación; este resultado indicó que la vacuna tuvo buena inmunogenicidad (Pensaert MB., *et al.*, 1990).

Los resultados mostrados en la granja de Jalisco nos dio un 85.5% de sueros positivos y sólo un 16.5% de sueros negativos, por lo que nos indica que el proceso de vacunación en general fue exitoso ya que la mayoría de los cerdos salieron positivos. Este resultado indicó que la vacuna tuvo una buena respuesta inmunitaria como otras vacunas que ya han sido probadas en el mercado (Pensaert MB., *et al.*, 1990; Swezda W., *et al.*, 1996).

En esta granja vemos que hay diferencias entre los lotes de cerdos; ya que unos sólo tuvieron un 63.3 y 67.5% de anticuerpos contra el VEA, lo que nos dice que no hubo una buena respuesta inmunitaria en estos lotes y que probablemente hubo un problema con el correcto funcionamiento de la cadena fría, ya que esta marca la diferencia entre vacunar a la población efectivamente o con biológicos inútiles, lo cual puede llegar a disminuir en forma dramática el poder inmunológico de las vacunas (www.sagarpa.gob.mx/Dgg/NOM/007ZOO.pdf).

Por ello la NOM – 007 – ZOO – 1994 dice que el manejo de las vacunas y antígenos deberá realizarse bajo estrictas medidas de conservación de los biológicos, a través de una eficiente operación de la cadena fría (para cumplir su objetivo la cadena fría cuenta con tres elementos: *Recurso humano*, que incluye a todas las personas que de una manera directa o indirecta, manipulen, transporten, distribuyen, vacunan o vigilan que los elementos donde se conservan o transportan los biológicos, reúnan los requisitos establecidos; *Recurso técnico*, elementos y aparatos para almacenar y distribuir; *Recurso financiero*, para asegurar el recurso humano y material); siendo esta una responsabilidad compartida entre productores y tenedores de cerdos, médicos veterinarios aprobados, empresas productoras, comercializadoras de productos biológicos y otros determinados por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación “SAGARPA” (www.sagarpa.gob.mx/Dgg/NOM/007ZOO.pdf).

En el caso de la granja de Hidalgo, se ve que por lote existe una diferencia menor en seropositividad ya que se tuvo hasta un 97.5% de anticuerpos contra el VEA, por lo que la vacuna en este caso produjo una respuesta inmunitaria como se esperaba.

En la granja de Sonora, no hubo vacunación, sólo se usó como control negativo, y eso se puede ver en que salieron todos los sueros negativos, esto se debe a que en estados como Sonora y Yucatán el virus de la enfermedad de Aujeszky se encuentra ya erradicado (Molina UP., *et al.*, 1998).

La SAGARPA nos dice que el aspecto zoonosario de las granjas, sigue teniendo un peso importante en lo que a productividad y competitividad se refiere aunque se ha avanzado con el “Programa Integral de Sanidad Porcina, 2003 – 2006”, el cual promueve entre otras cosas, acciones concretas a nivel de granjas, estados y regiones, a fin de que en un corto plazo se alcancen estatus zoonosarios superiores relacionados con la enfermedad de Aujeszky, pretendiendo que con esto México se encuentre libre. La condición de la enfermedad de Aujeszky se muestra en el cuadro 7 (www.sagarpa.gob.mx).

| Libre | Erradicación | Escasa Prevalencia | Control |
|---|----------------|---|--|
| Baja California, Baja California Sur, Campeche, Chiapas, Quintana Roo, Sonora y Yucatán | Aguascalientes | Chiapas, Guerrero, Hidalgo, Nayarit, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí. Tamaulipas | Coahuila, Colima, Distrito Federal, Durango, Guanajuato Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Querétaro, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas |

Cuadro 7. Situación epizootiológica de la enfermedad de Aujeszky.

Se encontró que en las granjas de Hidalgo y Jalisco se tuvo un 68% de seropositividad a la enfermedad de Aujeszky, lo que se considera elevado según otros autores (Vannier P., *et al.*, 1991).

Con base en varios estudios realizados en otros países, se sugiere que para el control de la Enfermedad de Aujeszky en una zona de alta densidad porcina, la vacunación intensiva es una herramienta útil para que el virus no se difunda a otras granjas (Lehman JR., *et al.*, 1993).

Las vacunas vivas atenuadas son capaces de establecer una infección latente y hoy en día es claro que las características genéticas de la cepa vacunal influyen en el modo de establecimiento y en su potencial de reactivación del estado latente (Puentes E., *et al.*, 2000).

El VEA puede persistir en gran cantidad de tejido porcino después de una infección activa: amígdalas, timo, nódulos linfáticos, pulmones, ganglio trigémino, cerebro, médula espinal, oído interno, médula ósea, macrófagos y linfocitos. El que todos pueden considerarse latentemente infectados o no dependerá del estado en que se encuentre el genoma viral y de su nivel de represión. Las cepas de vacuna viva atenuada con un alto potencial para establecer latencia podrían prevenir que cepas salvajes infecciosas se establezcan de forma latente (Wesley RD., *et al.*, 1996).

Ciertos estímulos pueden reactivar el virus latente en condiciones experimentales: los tratamientos inmunodepresores, las fluctuaciones de temperatura, la inducción de estrés. 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, incluyendo anticuerpos neutralizantes, que aparentemente tienen dificultado el acceso al virus. La excreción de virus es intermitente durante las tres semanas siguientes al tratamiento inmunodepresor y mucho más reducida durante la primoinfección (Wesley RD., *et al.*, 1996).

Otros autores han estudiado las vacunas de virus atenuado y se han recomendado para ser utilizadas en los animales de la línea de producción, ya que la inmunidad que inducen eleva el umbral de infección y, en caso de que los

animales inmunizados se infecten, se reduce la cantidad de virus excretado. Utilizada de manera constante en la piara, con el tiempo el virus deja de circular, lo que permite eliminar a los animales con infección latente en un tiempo mucho menor, en comparación con las vacunas inactivadas (De Leeuw PW., *et al.*, 1985; Swezda W., *et al.*, 1996).

Para saber como funciona la campaña de vacunación se detectan anticuerpos frente a la glicoproteína B, presente en el virus vacunal y en el de campo. Para diferenciar animales vacunados de infectados es obligatorio utilizar una vacuna marcada, a la que se le ha delecionado la glicoproteína E (no esencial) del virus del campo. Los animales infectados desarrollan anticuerpos anti – gE, pero no los vacunados, de forma que pueden diferenciarse fácilmente y en función de la prevalencia existente pasar a la erradicación. Para la detección se emplea una ELISA de competición (Castro D. A., *et al.*, 2000).

La prueba de ELISA Competitiva se basa en la competencia que se establece al unirse al antígeno vírico entre los anticuerpos monoclonales específicos de un suero problema y los anticuerpos monoclonales específicos conjugados con una enzima por unirse al antígeno vírico. Esta prueba detecta niveles más bajos de anticuerpos. Los anticuerpos que detecta la prueba comercial son los anticuerpos IgG (Sánchez JM., 1997).

Los objetivos fueron cumplidos, ya que por medio de la técnica de ELISA se pudieron determinar los anticuerpos del virus de la enfermedad de Aujeszky y esta técnica es la más utilizada para el monitoreo de granjas debido a que es una técnica sencilla y rápida y permite realizar estudios de una gran cantidad de animales en poco tiempo.

Este estudio sirvió para comparar la eficiencia de una vacuna atenuado en diferentes granjas de México, por lo que se vio en este estudio se puede utilizar

como una herramienta en el control y erradicación del virus de la enfermedad de Aujeszky y así se contribuiría a una mejora en el comercio ya que esto permitirá acceder con mayor facilidad a los mercados y al mismo tiempo se tendrá un incremento en la productividad ganadera.

6. IMPLICACIONES

Se encontró que en las granjas de Hidalgo y Jalisco se presentó un 68% de seropositividad a la enfermedad de Aujeszky, con base en este trabajo se puede concluir que la vacuna utilizada tiene una buena respuesta inmune humoral, por lo tanto se podría recomendar para implantar un programa de control de la Enfermedad de Aujeszky en cada granja con esta vacuna o una similar; como lo han hecho Sweda W, *et al.*, 1996 y Castro G. D., *et al.*, 2000. Para esto sería necesario que los porcicultores estén concientes de las pérdidas económicas que le causan la infección en los animales y las ventajas de tener la granja libre de este virus.

Se que la inmunidad celular es una parte importante del sistema inmunitario, ya que esta actúa a nivel intra y extracelular. Bloqueando la replicación del antígeno fomentando su destrucción. Esto es de gran importancia ya que detectan respuestas inmunológicas tempranas, por lo que para evaluar la inmunidad celular se podrían realizar pruebas como: Estimulación de Linfocitos, Inhibición de la migración de Leucocitos, Células Natural Killer, Citotoxicidad anticuerpo/dependente, Células T – citotoxicidad. Esto se propone para evaluar completamente la respuesta inmunitaria de la vacuna (Fuentes M., 1990).

7. REFERENCIAS

7.1 Bibliográficas.

1. Fojx A., Alemany R., Saubi N., Espuña E., Artigas C. 1995. Desarrollo y adaptación de la técnica IPMA para el diagnóstico de la Enfermedad de Aujeszky. I Symposium de Avedila, Exooáviga' 95. 777 – 778.
2. Fuentes Martha. 1990. Pruebas de laboratorio para el diagnóstico de la enfermedad de Aujeszky (Pseudorabia). Memorias. Curso sobre actualización de enfermedades virales del cerdo. UNAM. AMVEC. Grupo Roussel S. A. 32 – 37.
3. Gustafson D. B. 1981. Pseudorabies in “Disease of swine” 5th. Ed. Ames Iowa State University Press. 209 – 223.
4. Kimman TG.1994. Immunological protection against Pseudorabies virus. OIE Symposium, Bangkok, Thailand. 11-22.
5. Kluge J. P., Beran G. W., Hill H. T., Platt K. B., 1999. Pseudorabies (Aujeszky's Disease). Diseases of Swine. 8th. Ed. Iowa State University Press. USA. 233 – 243.
6. Molina U. P., Medina T. J. 1998. Regionalización: Vigilancia epidemiológica en la península de Yucatán [resumen].XXXIII. Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos AMVEC. 173.
7. Nauwyncy HJ, Pensaert MB. 1994. Programmes for the eradication of Aujeszky's disease virus in the members states of the European Union. OIE Symposium Bangkok, Thailand. 56-65.
8. Prontuario de Especialidades Veterinarias Farmacéuticas, Biológicas y Nutricionales, PLM. 2001 – 2002. Edición 21.
9. Sánchez J. M. 1997. Estrategias en el control y erradicaión de PPC y EA. Memoria, VII Congreso latinoamericano de veterinarios especialistas en cerdos y V Congreso Nacional de Producción Porcina. Río Cuarto Córdoba. 5 – 10.

10. Swezda W., Lipowski A., Baczek W., Dadun M. 1996. The results of 2 – years Aujeszky's disease farms. Proceedings of the 14th IPVS, Congress. Bologna Italy. 7 – 10. pp 155.

7.2 Hemerográficas.

1. Afschar A., Dulac G. C., 1986. Immunoperoxidase plaque staining for the detection of Pseudorabies virus. *J. Vet. Res.* 50: 118 – 119.
2. Allan G. M., Mc Nulty M. S., Mc Cracker R. M., Mc Ferran J. B. 1984. Rapid diagnosis of Aujeszky's disease in pigs by Immunofluorescence . *Res. Vet. Sci.* 36: 235 – 239.
3. Allan G. M., Mc Nulty M. S., Mc Cracker R. M., Mc Ferran J. B. 1985. The rapid detection of Aujeszky's disease virus in pigs by direct immunoperoxidase labelling. *Vet. Microbiol.* 10: 481 – 486.
4. Banks M. 1983. Rapid ELISA for Aujeszky's disease eradication. *Vet. Rec.* 23: 94 – 95.
5. Bartha A., Belank S., Benyeda J. 1969. Trypsin and heat resistance of some strains of the herpesvirus group. *Acta. Vet. Acad.* 19: 97 – 99.
6. Briaire J. R., Melen R. M., Bartelin S. J. 1979. An enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibody against Aujeszky's disease in pig sera. *Veterine. Med.* 26: 76 – 81.
7. Canals A., Sánchez J. M., Zamora M. J., Arias M. 2000. Diagnóstico de la Enfermedad de Aujeszky: Características y Respuesta Inmunológica. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) y Centro de Investigación en Sanidad Animal(CISA) Valdeomos, Madrid.
8. Castro G. D. A., Diosdado V. F., Rosales O. C., León C. A., Morilla G. A. 2000. Frecuencia de la enfermedad de Aujeszky en granjas porcinas de ciclo completo de la zona centro de México. *Téc. Pecu. Méx.* 2: 81 – 88.

9. Castro G. D. A., Diosdado V. F., Rosales O. C., Morilla G. A. 2000. Inmunogenicidad y contagiosidad de una vacuna de virus vivo atenuado contra la Enfermedad de Aujeszky en cerdos. *Vet. Mex.* 31(3): 255 – 257.
10. Corner A. H. 1965. Pathology of experimental Aujeszky's disease in piglets. *Res. Vet. Sci.* 6: 337 – 343.
11. Davies E. B., Beran G. W., 1981. Influence of environmental factors upon the survival of Aujeszky disease virus. *Res. Vet. Sci.* 31: 32 -36
12. De Leeuw P. W., Van Otrschot J. T. 1985. Vaccines against Aujeszky's disease: evaluation of their efficacy under standardized laboratory conditions. *Vet. Q.* 7: 12 – 16.
13. Done J. T. 1957. The pathological differentiation of disease of central nervous system of the pig. *Vet. Rec.* 3: 436 – 442.
14. Dow C., Mc Ferran J. B. 1962. The neuropathology of Aujeszky's disease in the pig. *Res. Vet. Sci.* 3: 436 - 442.
15. Echeverría M- G., Noretto E. O. 2000. Actualización de la Enfermedad de Avance Veterinario. 20: 22 – 30.
16. Esontos L., Ej. L., Szabo I. 1962. A contribution to the actiology of Aujeszky's disease in the pig: Focal damage and abortion due to the virus. *Acta, Vet. Sci.* 12: 17 – 23.
17. Esontos L., Ej. L., Szeky A. 1966. Gross and microscopic lesions in the nasopharynx on pigs with Aujeszky's disease virus. *Res. Vet. Sci.* 6: 337 – 343.
18. Falser N., Bondtlow I., Hass M., Wolf H. 1986. Detection of Pseudorabies virus DNA in the Inner Ear of Intranasally Infected Balble Mice with Nucleic Acid Hybridization in situ. *J. Virol.* 57: 335 – 339.
19. Gutekunst D. E., Pirtle E. C., Mengeling W. L. 1978. Development and evaluation of microimmunodiffusion test for detection of antibodies to pseudorabies virus in swine serum. *Am. J. Vet. Res.* 39: 207 – 210.
20. Iglesias G. 1987. Infección con el virus de la enfermedad de Aujeszky en credos. *Ciencia Veterinaria.* 4: 225 – 255.

21. Lehman J. R., Weigel R. M., Siegel A. M., Herr L. C., Taft A. C., Hall W. F. 1993. Progress after one year of a Pseudorabies eradication program for large swine herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 203: 118 – 121.
22. Mathews R. E. F. 1982. Clasificación y nomenclatura de los virus de vertebrados. *Intervirology.* 17: 1 – 3.
23. Mc Ferran J. B., Dow C. 1965. The distribution of the virus of Aujeszky's disease (pseudorabies virus) in experimentally infected swine. *Am. J. Vet. Res.* 26: 631 – 635.
24. Morilla G. A., 1996. Control y erradicación de la enfermedad de Aujeszky. *Ciencia Veterinaria.* 7: 242 – 266.
25. Narita M., Invi S., Shimizu Y. 1984. Tonsillar changes in pigs given pseudorabies (Aujeszky's disease) virus. *Am. J. Vet. Res.* 45: 247 – 251.
26. Pensaert M. B., De Smet K., De Waele K. 1990. Extent and duration of virulent virus excretion upon challenge of pigs vaccinated with different glycoprotein – deleted Aujeszky's disease vaccines. *Vet. Microbiol.* 22: 107 - 117.
27. Puentes E., Cancio E., Seoane R. 2000. La enfermedad de Aujeszky: Latencia. Universidad de Santiago de Compostela. Facultad de Medicina Santiago La Coruña.
28. Roizman E. Watson D. H., 1977. Unity and diversity in the herpesvirus. *J. Gen. Virol.* 37: 15 – 38.
29. Romero L. J., Sánchez J. M., Zamora M. J., Arias M. 2000. Diagnóstico de la Enfermedad de Aujeszky. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) y Centro de Investigación en Sanidad Animal(CISA) Valdeomos, Madrid.
30. Sánchez C., Romero L. J., Sánchez J. M. 2000. Epidemiología de la Enfermedad de Aujeszky. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) y Centro de Investigación en Sanidad Animal(CISA) Valdeomos, Madrid.
31. Sánchez C., Sánchez – Martín M. A., Sánchez - Vizcaino J. M. 2000. Signos clínicos y lesiones en la Enfermedad de Aujeszky. Instituto Nacional de

Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) y Centro de Investigación en Sanidad Animal(CISA) Valdeomos, Madrid.

32. Serratosa V. J., Pujols F., Badiola S., Pérez de Rozas A. 1989. Bases para el control y la erradicación de la enfermedad de Aujeszky. ONE. 2ª, época. 84: 16 – 31.
33. Smith P. C., Mengelin W. L. 1977. A skin test for pseudorabies virus infection in swine. Can. J. Comp. Med. 41: 364 – 368.
34. Thacker B., Maes R., Vilnis A., Sussman M., Senn M. 1996. Pseudorabies virus Vaccination: influence on viral latency. Proceedings of the 14th IPVS, Congress. Bologna Italy. 7 – 10. pp 138.
35. Thawley D. G., Gustafson D. P. Beran G. W. 1982. Procedures for the elimination of pseudorabies virus from herds of swine. J. Am. Vet. Med. Assoc. 81: 1513 – 1518.
36. Thawley D. G., Morrison R. B. 1988. Programs for the elimination of pseudorabies virus from large herds of swine. J. Am. Vet. Med. Assoc. 183: 184 – 190.
37. Todd D., Mc Nair J., Mc Nulty N. J., Mc Ferran J. B. 1981. Enzymelinked immunosorbent assay for detecting antibodies to Aujeszky's disease virus in pigs. Vet. Rec. 109: 534 – 537.
38. Van Oirschot JT. 1989. The antibody response to glycoprotein I and the control of Aujeszky's disease virus. Vaccination and control of Aujeszky disease. In: Van Oirschot JT, ed. Vaccination and control of Aujeszky's disease. Dordrecht Kluwer Academic Publishers. 129-138.
39. Vannier P., Elliot M. E., Gouello L., Le Bail P., Toma B. 1991. Epidemiological studies of the persistent of Aujeszky's disease virus between and within herds in France. Prev. Vet. Med. 11: 115 – 123.
40. Vannier P., Hutel I., Bourguell E., Corionel R. 1991. Level of virulent virus excreted by infected pigs previously vaccinated with different glycoprotein deleted Aujeszky's disease vaccines. Vet. Microbiol. 29: 213 – 223.

41. Wesley R. D., Cheung A. K. 1996. A pseudorabies virus mutant with deletions in the latency and early protein D genes; replication, virulence and immunity in neonatal piglets. J. Vet. Diagn. Invest. 8. 21 – 24.

7.3 Internet.

1. www.sagarpa.gob.mx
2. www.sagarpa.gob.mx/Dgg/NOM/007ZOO.pdf
3. <http://vh2.boehringer-ingenelheim.es:8000/productos/veterinaria/aujeszky>