



**UNIVERSIDAD DE ORIENTE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES**  
**CENTRO DE ESTUDIOS DE BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL**

**Título: Armonización de la vacuna Aujeszky inactivada, según las normas de la OIE, en cuanto a los criterios de inocuidad y potencia.**

**Tesis presentada en Opción al Título Académico de Máster en Biotecnología.  
Mención Industrial.**

***Autor: Dr.M.V. Alberto de Armas Ricardo.***

**Tutores: Dr. Rafael Polanco.**

**MSc. Tania Campos Cuello.**

**Consultante: MSc. Humberto J. Morris Quevedo.**

**Dr. M.V. Fredy Lorenzo.**

*Año 2005.*

*“Año de la Alternativa Bolivariana para las Américas”*

Dedicatoria:

A mis padres, por ayudarme a crecer cada día más  
ante la vida.

## Pensamiento

La inteligencia tiene dos fases distintas: la de creación y la de aplicación, cuando aquella no se une a esta, hace desventurados y mártires, enfermos incurables del dolor perpetuo de la vida; la de aplicación, con ser mas noble, es más adecuada y necesaria a la existencia: una y otras mezcladas son germen escondido del bienestar del país.

**José Martí**

## Agradecimientos:

- A todos lo que de una forma u otra contribuyeron a la culminación de este trabajo.
- A la Dra. Merles Bridón Vázquez, por haberme dedicado gran parte de su tiempo.
- A mi amiga y tutora MSc. Tania Campos Cuello.
- A mi amigo y asesor Dr. Fredy Lorenzo.
- Al MSc. Humberto Morris Quevedo, por haberme dedicado su apoyo incondicional.

## **RESUMEN**

Se realizó la armonización del lote 0409002 de la vacuna inactivada Aujeszky según las Normas de la Oficina Internacional de Epizootias (OIE), atendiendo a los criterios de inocuidad y potencia. Se muestrearon 69 animales de la Unidad Genética Porcina “Pomona”, de la provincia La Habana, y mediante la técnica de Seroneutralización (SN), se determinó la presencia de animales susceptibles.

Los lechones susceptibles vacunados con una y dos dosis y los controles fueron evaluados en la prueba de Inocuidad, no presentándose reacciones adversas ni otras atribuibles al producto vacunal. En la prueba de potencia por SN, se demostró que los controles fueron seronegativos con títulos 1:2 y en los vacunados con dos dosis se obtuvieron títulos de 1:4 a 1:8, arrojando resultados satisfactorios. La vacuna armonizada, además de mejorar la calidad, ahorra 9125.50 MN anualmente.

## **ABSTRACT**

According to the standards of the Office of International Epizootics (OIE), the lot 0409002 of the Aujeszky's Disease inactivated vaccine was harmonized, considering the innocuousness and potency criteria. 69 animals of the “Pomona” Genetic Hogs Unit of Havana Province were sampled and, by the Serum Neutralization (SN) test, the presence of susceptible animals was determined.

The susceptible pigs vaccinated with one and two doses and the control pigs were assessed by the innocuousness test. No adverse reaction or other reactions attributable to the vaccine occurred. In the potency test by SN, it was demonstrated that the control pigs were seronegative at 1:2 and the pigs vaccinated with two doses developed antibodies titres at 1:4 and 1:8, thus showing successful results. Besides gaining in quality, the harmonized vaccine saves \$ 9125.50 CUP to the country per year.

## Índice.

Contenidos	Pág.
<b>Introducción</b>	1-2
<b>Capítulo 1: Revisión bibliográfica</b>	3-15
1.1 Evolución geográfica de la EA	3
1.2 Agente etiológico de la EA.	3
1.2.1 Resistencia a la acción físico química y medio ambiental.	4
1.2.2 Patogenia y Replicación	4-5
1.2.3 Latencia	5
1.3 Sintomatología	5-7
1.4 Lesiones macroscópicas y microscópicas	7
1.5 Inmunología.	7-9
1.6 Diagnóstico.	9-12
1.7 Prevención y control	12
1.7.1 Vacunación	13
1.7.1.1 Vacuna producida en Cuba	14-15
<b>Capítulo 2: Materiales y Métodos</b>	16-23
<b>2.1 Materiales</b>	16
2.1.1 Equipos, cristalería y misceláneas.	16
<b>2.1.2</b> Medios nutritivos, productos biológicos y sistemas biológicos	17
<b>2.1.3</b> Reactivos	17
2.1.4 Soluciones	17
<b>2.2 Métodos</b>	17
2.2.1 Animales susceptibles	17-18
2.2.1.1 Extracción de sangre y obtención del suero para la seroneutralización	18
2.2.1.2 Técnica de seroneutralización.	18-20
2.2.2 Inmunógeno	20
2.2.3 Esquema de inmunización desarrollado en los lechones-lechonas susceptibles.	20
2.2.3.1 Prueba de Inocuidad según Manual Estándar de la OIE	21
2.2.3.2 Termometría	21
2.2.3.3 Determinación del peso corporal de los animales	21
2.2.4 Prueba de Eficacia inmunológica (Potencia) mediante la técnica de SN	21
2.2.4.1 Respuesta humoral evaluada mediante la técnica de SN	22
2.2.5 Prueba de Inocuidad y Potencia según tecnología de producción de la vacuna cubana	22
2.3 Análisis Estadístico:	22-23
<b>Capítulo 3: Resultados y Discusiones</b>	24-34
3.1 Determinación de la susceptibilidad de la especie porcina a la EA.	24-26
3.2 Evaluación de la Inocuidad según Manual Estándar de la OIE.	26-29
3.3 Evaluación de la eficacia inmunológica (Potencia) mediante la técnica de SN.	29-32
3.3.1 Evaluación de la respuesta humoral mediante SN.	32-33

3.4 Resultados de la prueba de Inocuidad y Potencia según tecnología de producción de la vacuna cubana	34
<b>Conclusiones</b>	35
<b>Recomendaciones</b>	36
<b>Bibliografías</b>	37-47
<b>Anexos</b>	

## INTRODUCCIÓN

La Biotecnología constituye la aplicación de principios científicos e ingenieriles a procesos donde agentes biológicos transforman un material en un producto que tiene una utilidad. Puede considerarse una de las vías o formas de dar solución a problemas complejos que enfrenta el hombre en el mundo de hoy. El principal impacto de la Biotecnología Médico-Farmacéutica en la rama Agropecuaria ha sido la detección, prevención y tratamiento de enfermedades mediante el uso de medios diagnósticos, biofármacos y vacunas que permitan el desarrollo de la ganadería de forma sostenible, en función de aumentar la productividad, disminuir la mortalidad e incrementar la conversión a proteína animal.

Los Laboratorios Biológicos Farmacéuticos. (LABIOFAM), elaboran productos biotecnológicos importantes en el sector farmacéutico y agrícola, siendo la empresa nacional clave en la prevención de enfermedades, al elaborar vacunas de uso veterinario que permiten un flujo zootécnico productivo eficiente.

Una de las patologías que en la actualidad afecta al ganado porcino es la enfermedad de Aujeszky (EA), conocida también como: Pseudorabia, Parálisis bulbar infecciosa y Prurito loco. Es una enfermedad viral infecto-contagiosa que en cerdos causa daños al Sistema Nervioso Central (SNC) y otros sistemas de órganos, como el tracto respiratorio. Estos animales constituyen un reservorio natural del virus que afecta también a un gran número de otras especies de mamíferos, donde se caracteriza por un prurito intenso, a diferencia de los porcinos. El virus se disemina por las unidades a través de diferentes fómites como objetos contaminados, aire, alimentos y leche. Las moscas se consideran como vectores propagadores de este virus que por su alta virulencia y mortalidad se considera en el grupo de riesgo II.

En Cuba se diagnosticó por primera vez en el año 1965, provocando grandes pérdidas económicas. En este sentido, la práctica de la vacunación se inició en el año 1986 con una vacuna inactivada, según una tecnología de producción elaborada por los Laboratorios Biológicos Farmacéuticos.

Para la producción de vacunas, el virus se reproduce en cultivos de células de fibroblastos de embriones de pollos. En los animales vacunados o áreas donde circula el agente en el campo el virus induce la formación de anticuerpos neutralizantes.

Para la prevención y control de la EA, además de emplear vacunas, es necesario realizar estudios seroepidemiológicos sobre la prevalencia del virus en la explotación y su dinámica de circulación en el campo. En la actualidad los métodos serológicos son los más utilizados, ya que han demostrado ser el marcador de infección más consistente. Los perfiles serológicos desempeñan un papel importante en el seguimiento, el mantenimiento del nivel de salud de las poblaciones porcinas, el manejo de estrategias de introducción de animales en reposición y para el diseño y evaluación de los planes de vacunación. Además es frecuente su aplicación en el conocimiento de la prevalencia puntual de las enfermedades infecciosas en porcinos. Al respecto, la técnica de seroneutralización (SN) nos permite corroborar la dinámica de la enfermedad, así como realizar la prueba de eficacia inmunológica de la vacuna.

Actualmente en nuestro país se presenta la EA fundamentalmente por fallos vacunales, generando pérdidas económicas, al emplear para su control el método radical que consiste en el sacrificio de la masa afectada.

La vacuna inactivada contra la EA se rige por tecnologías cubanas, realizándose la prueba de eficacia inmunológica (potencia) y la inocuidad en carneros. Para que Cuba obtenga una vacuna armonizada con mayor calidad y mejores posibilidades económicas debe regirse por las normas técnicas del Manual Estándar de la Oficina Internacional de Epizootias (OIE), que exigen la realización de las pruebas de potencia e inocuidad en cerdos susceptibles, es decir en la especie a la cual va dirigida la inmunización.

Tomando en consideración los elementos anteriores en el presente trabajo se trazo la hipótesis: “Si se realizan los estudios de potencia e inocuidad de la vacuna cubana contra la enfermedad de Aujeszky en porcinos, según las normas de la OIE, entonces se podrá disponer de un producto armonizado con calidad y mejores posibilidades económicas”.

## **Objetivos**

### a) General

- Armonizar la vacuna cubana contra la EA según las normas internacionales establecidas por el Manual Estándar de la OIE, atendiendo a los criterios de inocuidad y potencia

### b) Específicos

- Determinar la susceptibilidad de la especie porcina a la EA.
- Evaluar la inocuidad de una vacuna inactivada contra la EA en cerdos susceptibles, según las normas internacionales establecidas por el Manual Estándar de la OIE.
- Evaluar la eficacia inmunológica de una vacuna inactivada contra la EA en cerdos susceptibles, según las normas internacionales establecidas por el Manual Estándar de la OIE.

## **CAPITULO 1: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **1.3 Evolución geográfica de la EA**

Actualmente esta patología se encuentra distribuida por todo el mundo, fundamentalmente en Europa y América. Se describió por primera vez en Europa en el año 1902, específicamente en Hungría por Aladar Aujeszky (1869-1933), aunque su agente causal no fue aislado hasta 1910 por Schmiedhoffer, quien confirmó su etiología viral. Sabin y Wright (1934) identificaron que el virus estaba relacionado inmunológicamente con el Herpesvirus simple y el Herpes  $\beta$ . [14]

Con anterioridad a 1902 Hanson describió en el American Farmer Magazine de los EUA en 1813, una enfermedad que producía picor en rumiantes a la que llamó “prurito loco”. Por otra parte, Shope (1931) observó que este virus era inmunológicamente idéntico a la cepa del virus de la Enfermedad de Aujeszky (VEA) descrita en Hungría y estableció que se trataba de la misma enfermedad y del mismo agente infeccioso. [41]

En EUA en 1960 aparece una alta incidencia de la enfermedad por incrementarse el confinamiento de los cerdos en las granjas y la aparición de nuevas cepas más virulentas. Diseminándose por diversas áreas de América. Se diagnosticó en nuestro país en el año 1965. [63]

### **1.4 Agente etiológico de la EA.**

La EA es producida por un virus del grupo Herpesvirus porcino (HVP) tipo 1, el cual pertenece a la familia Herpesviridae, subfamilia Alphaherpesviridae, género Varicellavirus, cepa autóctona (no mutante). [36, 63, 86]

El virus mide 110-150 nm de diámetro, aunque se han encontrado hasta de 230 nm, tiene forma oval o cilíndrica. Posee una doble cadena lineal de ADN, situada en la parte central, la molécula de ADN tiene de 120 – 200 Kb y está rodeada por una cápside icosaédrica, constituida por 162 capsómeros. Más exteriormente posee un tegumento amorfo que contiene más de 30 estructuras proteicas, todo ello envuelto en una cubierta de glicoproteínas (gp) rica en lípidos, derivada del aparato de Golgi de la célula afectada. [19, 28]

Existen cepas neurotropas y otras que tienen mayor afinidad por el aparato respiratorio, aunque la afinidad puede estar relacionada con la vía de penetración al organismo. Pueden aparecer cepas que afectan tanto el sistema nervioso como el respiratorio. [14, 17]

#### **1.4.1 Resistencia a la acción físico química y medio ambiental.**

El tiempo de inactivación del VEA se reduce en función del aumento de la temperatura. La inactivación dependiente de la temperatura es inversamente proporcional al tiempo: a 25 °C se

inactiva en 8 días, a 37 °C en 24 horas, a 55 °C en 50 minutos, a 60 °C en 30 minutos, a 70 °C en 10 minutos, a 80 °C en 3 minutos, mientras que a los 100 °C ocurre inmediatamente. [14, 19, 63]

El virus está encapsulado y por tanto, se inactiva rápidamente con la sequedad, la luz solar y las altas temperaturas. Es estable a valores de pH comprendidos entre 5 – 12 y el tiempo de inactivación se reduce significativamente cuando se combinan pH bajos o altos con elevadas temperaturas. La luz solar lo inactiva entre 2 a 8 semanas y puede persistir hasta 7 horas en el aire con humedad relativa superiores al 55 %. Puede transportarse vía aerosol desde 2 Km. hasta 40 Km. de distancia. [120, 125]

La resistencia del VEA es muy alta y el virus no muere durante el proceso de maduración de la carne a 4 °C. En aguas de lagunas, fosas y tierra se inactiva en menos de 48 horas y en heno sobrevive 40 días, mientras que en los establos e instalaciones vive 2 meses. Persiste tres días en lavados nasales sobre plásticos y pienso porcino, 4 días en lecho de pajas y en orina el virus es capaz de sobrevivir durante 3 semanas en verano y entre 8 y 18 semanas en invierno. En los purines y estiércol es capaz de sobrevivir un mes durante el verano y dos meses en el invierno, en putrefacción se inactiva en 11 días.[139]

El VEA es muy sensible a los disolventes orgánicos y a los desinfectantes, particularmente al cloroformo y al éter. Los derivados fenólicos destruyen completamente el virus en 5 minutos a temperatura ambiente, la formalina al 0.5 % la inactiva en 8 minutos y la sosa cáustica al 2 % lo destruye inmediatamente. En agua poco clorada sobrevive 7 horas, en salmuera hasta 20 días y los detergentes semejantes al Nonidet P-40 y Tritón X-100 lo destruyen rápidamente.[14,120, 137]

### **1.2.2 Patogenia y Replicación**

La vía de entrada más habitual en las infecciones naturales es la vía respiratoria por inhalación del VEA, replicándose en la región nasofaríngea y aparato respiratorio. Desde este nivel invade el SNC para diseminarse luego vía linfática hasta los ganglios linfáticos regionales y de forma centrífuga por otras partes del organismo. Su entrada también se produce por la vía oral por ingestión de leche, agua o piensos contaminados, por la vía genital o la vía transplacentaria, durante la gestación.[17, 19]

El virus penetra en el SNC a través de las terminaciones nerviosas del nervio olfatorio trigémino y glossofaríngeo. A partir de aquí llega a la médula oblonga y puente, donde el virus se replica en las neuronas. 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, pero si la cepa es de virulencia alta existe una diseminación al resto del encéfalo. El virus puede estar presente en el suero y también asociado a células blandas de la sangre.[28, 36]

El VEA se replica en una gran variedad de cultivos primarios y secundarios, así como en líneas celulares estables provocando un efecto citopático (ECP) en las células infectadas. La replicación ocurre en el núcleo de la célula hospedera.[63,72]

### **1.3.3 Latencia**

La latencia es la propiedad que permite a los Herpesvirus sobrevivir en estado inactivo en ciertos lugares del organismo de los animales convalecientes. Los cerdos recuperados de una infección pueden retener el virus dentro de sus células sensoriales, fundamentalmente en ciertos tejidos neuronales específicos (ganglios sensorial, trigémino y espinal). Bajo ciertas condiciones ambientales o de estrés, el virus se reactiva comenzando su excreción y entonces se desencadenan los signos clínicos, aunque puede haber excreción viral sin presentación de sintomatología. Esto provoca ciclos alternativos de latencia y reactivación, lo que explica la capacidad viral de perpetuarse entre poblaciones porcinas.[63, 85,105, 136]

El establecimiento de una infección latente implica que la producción de virus infeccioso ha cesado, pero su genoma se mantiene presente dentro de las células. Durante esta etapa se involucran tanto factores moleculares, virales como celulares.[111]

### **1.4 Sintomatología**

La EA depende de varios factores, entre los que se destacan la virulencia de la cepa, la edad del animal, la dosis infectiva, la vía de infección, así como el estado inmunitario del huésped.[14, 15]

Existen cepas de virulencia alta, moderada y baja y aunque todas infectan al cerdo, no todas provocan la misma sintomatología. La resistencia a desarrollar síntomas clínicos se incrementa con la edad. Cepas de baja virulencia no producen signos en adultos y la replicación vírica en estos casos se ve limitada a la puerta de entrada. La infección por vía oral necesita mayores cantidades que la infección por vía nasal, y los lechones requieren menores concentraciones de virus para infectarse que los cerdos adultos.[17, 18]

Generalmente los síntomas nerviosos se observan en animales muy jóvenes, mientras que los respiratorios se evidencian en cerdos de engorde o adultos.[39]

En lechones menores de 3 semanas, el período de incubación es de 2 a 4 días. El cuadro clínico se inicia con fiebre ( $41^{\circ}\text{C}$ ), ptialismo, anorexia, apatía y vómitos; algunos desarrollan síntomas nerviosos desde temblores musculares, ataxia, nistagmos a convulsiones epileptiformes, coma y muerte. La mortalidad suele ser del 100%. [41]

Cuando los lechones se infectan por vía intrauterina y nacen vivos, suelen morir en los 2 primeros días. Si la infección se produce en el momento del parto, aparecen los síntomas durante los 2 primeros días y mueren normalmente al quinto día. Estos síntomas clínicos no se observan cuando los lechones poseen una buena inmunidad calostrual pudiendo sufrir una infección subclínica. [52]

En lechones de 3 a 9 semanas, los síntomas son parecidos a los que se presentan en lechones menores de 3 semanas, aunque menos graves. Un reducido número de animales puede presentar síntomas nerviosos, coma y muerte. El período de incubación en este caso es de 3 a 6 días. En otros animales se observan síntomas respiratorios (estornudos, secreciones nasales, disnea, tos) asociados con infecciones bacterianas secundarias o concurrentes por *Pasteurella multocida* o *Actinobacillus pleuropneumoniae*. [63]

El VEA interfiere con la función fagocítica de los macrófagos alveolares, reduciendo la capacidad de defensa que poseen estas células frente a las bacterias. La mortalidad varía del 10 al 50 %.[63]

En cerdos de engorde (desde 9 semanas hasta el sacrificio), los síntomas nerviosos aparecen esporádicamente, produciéndose temblores musculares y convulsiones violentas. Después de 3 a 6 días de incubación se observa fiebre (41 – 42 °C), depresión, anorexia, rinitis, estornudos, secreción nasal, neumonía y pérdida de peso. Los procesos respiratorios se asocian con infecciones bacterianas secundarias o concurrentes y la mortalidad es del 1-2%.[14,15]

En cerdos adultos los síntomas no suelen ser graves. Los síntomas nerviosos se presentan en raras excepciones, apareciendo con mayor frecuencia síntomas respiratorios leves.[41, 52]

Los verracos pueden presentar una infertilidad transitoria al existir inflamación escrotal por edema subcutáneo, periorquitis y calidad espermática alterada.[39, 63]

En hembras gestantes la infección durante el primer tercio de 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 nacimientos de animales débiles. Esto es posible ya que 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 morir.[52, 63]

#### **1.4 Lesiones macroscópicas y microscópicas**

Macroscópicamente a menudo las lesiones no son detectables en cerdos muertos a causa de la infección del VEA. Por lo general, se observa rinitis serosa, tonsilitis necrótica, ganglios linfáticos pulmonares hemorrágicos, edema pulmonar, neumonía intersticial, pleuritis y pueden aparecer focos de necrosis en hígado, bazo y riñones, queratoconjuntivitis y se describe la enteritis necrótica en yeyuno e íleon en cerdos jóvenes.

Cuando los animales sufren sintomatología nerviosa se observa una marcada congestión de las meninges, acompañada de exceso de líquido cefalorraquídeo, meningoencefalitis y ganglioneuritis con discreta mielitis.

En cerdas recién abortadas aparece endometritis, útero engrosado y edematoso y la placenta puede presentar placentitis necrótica. Los fetos abortados presentan focos de necrosis en hígado, bazo y focos de necrosis hemorrágicos en pulmón y tonsilas. En verracos se ha descrito edema escrotal.[32,41]

Microscópicamente las lesiones se encuentran principalmente en el SNC, sobre todo en el cerebro, tanto en la materia gris como en la blanca y se caracterizan por infiltraciones en la glia

de forma difusa y local, combinada con infiltraciones perivasculares y meníngeas de linfocitos, neutrófilos y macrófagos. Estas lesiones aparecen en la médula espinal, plexos, ganglios nerviosos autónomos y ganglios cerebro espinal cardíaco y celíaco. Se observan cuerpos de inclusión intranucleares en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. En el tracto respiratorio aparece infiltración de células mononucleares en la submucosa.[48, 63]

## 1.8 Inmunología.

En la envoltura vírica están presentes las glicoproteínas (gp) que son los componentes estructurales reconocidos por el sistema inmune. Son mediadores importantes en la interacción del virus y la célula diana durante la infección vírica. En el caso del VEA han sido identificadas diez de estas moléculas.

En el 18 Taller Internacional de *Herpesvirus* de 1933, se decidió cambiar la nomenclatura de todas las gp de la membrana, tomando como estándar las gp del Herpes simple tipo 1.[20, 28]

Las gp de la envoltura se clasifican como esenciales y no esenciales basado en los requerimientos del virus para poder crecer en los cultivos celulares. Existen 5 gp del VEA no esenciales (gp C, gp E, gp G, gp I y gp M) y 5 gp esenciales (gp B, gp D, gp H, gp K y gp L). Estas gp actúan como inmunógenos e inducen la respuesta inmune del animal y aparecen en la superficie de las células infectadas por el VEA, lo que permite el reconocimiento y eliminación de estas células. Las gp B, gp C y gp D 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.[45, 53,63]

- gp B: Es la que está en mayor cantidad en la envoltura vírica e induce la formación de anticuerpos (Ac) neutralizantes. Tiene un papel esencial en la penetración de viriones libres dentro de las células y en la fusión de membranas entre la envoltura del virión y la membrana citoplasmática de la célula, así como en la diseminación del virus de célula a célula.

- gp C: Aunque no es esencial participa en la termoestabilidad vírica, induce Ac neutralizantes y es el antígeno (Ag.) diana para los linfocitos T citotóxicos.

Kritas y Pensart [55], no observaron que la deficiencia de estas gp disminuyera la neurovirulencia de la cepa. Al contrario, Mettenleiter et al.[70], sí observaron una disminución. Este hallazgo sugiere que la gp C podría estar implicada en la neuropatogénesis del VEA, aunque dependiente de la edad de los cerdos, ya que Kritas y Pensart [55], utilizaron animales de una semana de edad, mientras que Mettenleiter et al.[70], los emplearon de tres semanas.

- gp D: Es esencial para la penetración del virus en las células y se ha demostrado su actividad durante la adherencia celular. Cuando las células expresan en sus membranas gp D pueden bloquear la superinfección de virus homólogos y de muchos otros alfa- herpesvirus heterólogos. Los Ac anti- gp D son potentes neutralizantes del virus. Se ha comprobado que la inoculación de la gp D purificada tiene un efecto protector en los animales, tras ser retados con una cepa virulenta del VEA.

- gp E / gp I: Estas dos gp precipitan frente al mismo antisuero, lo que indican que están formando un complejo en las células infectadas y actúan en la liberación de los viriones de éstas. No son esenciales para la replicación del virus en cultivos celulares. La gp E en los animales posee un papel importante en la infección del SNC y los Ac anti – gp E no son neutralizantes.

- gp G: Es no esencial y es secretada en grandes cantidades al medio de cultivo de células infectadas, siendo el resultado de un proceso proteolítico cuando se fusiona el virión a la membrana celular.

- gp H / gp L: Son gp esenciales. La gp H es un componente estructural del virión y forma un complejo con la gp L, interviene en la penetración del virus en la célula y en la diseminación de célula a célula y la propagación en el sistema nervioso. La coprecipitación de la gp H por Ac anti- gp L indica la presencia de un complejo gp H / gp L

- gp K / gp M: Los genes de estas dos gp han sido caracterizados pero todavía se desconocen algunas de sus funciones. Se plantea que la gp M tiene un papel modulador en la función de penetración en el inicio de la infección.

Los Ac neutralizantes frente al VEA son detectados después de la primera semana de la infección y su pico máximo aparece a las dos o tres semanas post- infección.

La Ig A también es detectada en el suero y en las secreciones muconasales de animales infectados o vacunados intranasalmente frente al VEA, pero la Ig A tiene una capacidad neutralizante débil.

No existe correlación entre el título de Ac y la protección frente a un reto, aunque no se puede despreciar el papel que desempeña la inmunidad humoral frente al VEA. Numerosos estudios han demostrado que los Ac presentes en el suero no son suficientes para detener la replicación del VEA. Sin embargo, está descrito que la inmunización pasiva de cerdos puede reducir la excreción del virus, evitar la manifestación de signos clínicos o incluso proteger frente a un reto con una cepa virulenta.

Existe una correlación entre el nivel de inmunidad materna y la protección frente a la invasión del VEA en el sistema nervioso de lechones recién nacidos.

La función de los Ac controlando la infección primaria es limitada, ya que en ésta aparecen tardíamente; sin embargo, juegan un papel vital en la reactivación y reinfección, limitando la diseminación del VEA y colaborando en la destrucción de las células infectadas por el VEA.[53, 60]

Está descrito que la inmunidad calostrada dura hasta el segundo o tercer mes de vida de los lechones, sufriendo a continuación una gran disminución.

La inmunidad mediada por células juega un papel fundamental en la infección por el VEA. La respuesta celular que se produce tras la infección o vacunación por el VEA, ha sido demostrada por diferentes mecanismos, como son: la inhibición de la migración de macrófagos y leucocitos y la proliferación de linfocitos en respuesta al VEA.

Se ha demostrado que los linfocitos T sensibilizados responden eficazmente a una reinfección al VEA, ya que proliferan, se dividen, sintetizan, y secretan citoquinas, a consecuencia de lo cual se lisan las células infectadas por el VEA.

Las gpC y gpD son los antígenos diana que inducen la proliferación de las células T en los cerdos positivos a VEA.[70]

## 1.9 Diagnóstico.

El diagnóstico de la EA se basa en la combinación de la historia de la granja (anamnesis), sintomatología, lesiones macro y microscópicas, detección o aislamiento del virus y los métodos serológicos.

Los métodos diagnósticos son los siguientes:

- Aislamiento viral: a partir de encéfalo, ganglio trigémino, tonsilas, bazo, pulmón, amígdalas o tejidos de fetos abortados, se elaboran suspensiones (fluidos) que se inoculan en cultivos primarios de riñón de cerdos, riñón de conejo y fibroblastos de pollo, cultivos secundarios y líneas celulares (en porcinos la línea celular PK – 15 es la que generalmente se emplea). El VEA produce ECP que aparece de 24 – 72 horas. En casos donde se afecten animales adultos sin mortalidad (casos agudos) se emplean muestras de hisopos nasales.

La confirmación puede obtenerse a través de tinciones con hematoxilina y eosina para demostrar las características acidofílicas e inclusiones intranucleares con marginación de la cromatina.

Los laboratorios que no presenten medios y equipos para el cultivo de células pueden inocular por vía intramuscular (IM) en conejos el material sospechoso. De contener el virus se inducen los síntomas patognomónicos, así como prurito en el área de inoculación, con la muerte de 2 a 5 días. [56, 63]

- Detección del antígeno vírico: Inmunofluorescencia directa (IFD) y tinción con inmunoperoxidasa.

- IFD: se utilizan cortes o improntas de tonsilas, encéfalo y faringe de animales sospechosos o de hígado y pulmón fetal. Para la detección del antígeno (Ag) vírico se utilizan inmunoglobulinas específicas conjugadas con isotiocianato de fluoresceína. La distribución de las imágenes fluorescentes se obtienen generalmente en el citoplasma de las células infectadas y en casos excepcionales en el núcleo. Con la IFD en animales jóvenes la EA se puede diagnosticar en 1 hora, aunque en adultos la IFD no es tan sensible como el aislamiento vírico. En cambio, si las muestras son citotóxicas o viejas la IFD es más sensible que el aislamiento viral.

Tinción con inmunoperoxidasa: se realiza sobre secciones de parafina o impronta de tejidos sospechosos. El revelado se realiza empleando un complejo de peroxidasa – antiperoxidasa o de avidina – peroxidasa. La reacción positiva se observa tanto en el núcleo como en el

citoplasma, con un depósito de color marrón rojizo. Es más lenta que la IFD, pero no necesita microscopio de fluorescencia, por otra parte es más sensible que el aislamiento vírico.[68,114]

- Detección del ADN vírico: La posibilidad de clonar fragmentos genómicos facilita la detección del VEA latente en los tejidos de los cerdos con un aceptable nivel de sensibilidad.[81, 82]

La hibridación *in situ* fue la prueba estándar para detectar el ADN vírico latente en secciones histológicas de tejidos diana para la latencia. En esta técnica los plásmidos recombinantes se hacen reaccionar directamente sobre los tejidos a analizar.[34]

La técnica de hibridación molecular consiste en obtener plásmidos recombinantes que contienen secuencias específicas del genoma VEA (ADN), los que se fijan a un soporte como filtros de nitrocelulosa y se hacen reaccionar con sondas radioactivas o marcadas enzimáticamente.

Posteriormente se han desarrollado técnicas de amplificación genómica (PCR) (Polymerase Chain Reaction), descrita por Mullis y Falloona (1987), que aumentan mucho la sensibilidad para la detección del virus latente en un período de tiempo muy corto (< 24 h). Detectan pequeñas cantidades del virus en estadios muy tempranos, incluso antes de los primeros síntomas.

Se puede detectar ADN vírico en biopsias de tonsilas sin tener que eutanasiar al animal, pudiendo evaluar si se ha producido latencia. Posibilita el análisis de muestras donde el virus ya no se encuentre viable o sea difícil realizar su aislamiento, como el semen. Las muestras de elección son el ganglio trigémino, riñón, encéfalo, amígdalas, ganglios linfáticos submandibulares y retrofaríngeos, timo, médula ósea, pulmón y líquido cefalorraquídeo.[104]

Detección de anticuerpos: Los métodos serológicos son los más usados para poner de manifiesto la presencia del VEA en una explotación. Se emplean numerosos ensayos y metodologías para detectar Ac específicos frente al VEA. Actualmente las técnicas más aceptadas son: Seroneutralización (SN), Aglutinación en látex y el ELISA (Enzyme – Linked Immunosorbent Assay).[106].

En la interpretación de los resultados serológicos en los lechones hay que tener en cuenta la duración de la inmunidad calostrual. Los Ac maternos pueden estar presentes hasta los 4 meses de edad. La vida media de los Ac maternos suministrado por el calostro de madres inmunizadas es de 18 días, es decir, a los 18 días el título se reduce a la mitad.[25]

- SN: Se basa en la detección de Ac neutralizantes en el suero de animales sospechosos que son producidos frente a las gp B, gp C, gp D, presentes tanto en todas las cepas del virus campo como en las cepas vacunales. Mide la capacidad de los Ac para neutralizar la infectividad vírica.[40]

Es la prueba estándar con la que se estudia la sensibilidad y especificidad de otras pruebas, permite medir los niveles de Ac circulantes y ha sido utilizada para detectar los animales infectados en ausencia de vacunación o mediante sueros pareados. La SN comienza a detectar Ac a partir de los 7– 10 días post inoculación con el VEA.

-- Aglutinación en látex: Detecta Ac frente al VEA, por aglutinación de las partículas de gp. Es una técnica sencilla y rápida, en la que aproximadamente a los 10 minutos se obtiene el resultado.[104,106]

-- ELISA: Posee alta sensibilidad y especificidad, permite realizar en pocas horas estudios sobre un gran número de animales de manera rápida, sencilla y económica. Se han desarrollado diferentes métodos de tipo indirecto, de bloqueo o competición. Moenning et al. (1992), observaron que existían sueros positivos a la SN y negativos al ELISA debido posiblemente a la existencia de sustancias en el suero diferentes a los Ac que fueran inhibidoras del virus. Esta técnica es de corta duración, la toxicidad de los sueros no es ningún problema para su realización, y los resultados se obtienen mediante una lectura automatizada. Los Ac producidos frente al VEA, comienzan a detectarse a partir de los 7 a 8 días del contacto.

ELISA diferencial: Los ELISA diferenciales para las gpE, gpC, gpD son una herramienta esencial en el control de la enfermedad, cuando son utilizados junto con vacunas delecionadas pudiendo diferenciar animales vacunados de infectados.

ELISA de competición o bloqueo: Se basa en la competencia que se establece por unirse al Ag vírico entre los Ac específicos de un suero problema y los Ac monoclonales específicos conjugados con una enzima..[106]

Debido a la similitud de los síntomas y las lesiones que se producen en las infecciones del VEA con los que se originan en otras enfermedades que afectan a la especie porcina, es necesario llevar a cabo un diagnóstico diferencial con aquellas enfermedades que producen cuadros clínicos patológicos similares.[120]

**Enfermedades Nerviosas:** Estreptococosis, Tétanos, Listeriosis, Cólera Porcino, Rabia, Enfermedad de Teschen, Encefalitis.,Meningoencefalitis, Intoxicación por Cloruro de Sodio, Hierro y Arsénico.

**Enfermedades Reproductivas:** Parvovirus, Enterovirus, Reovirus, Adenovirus, Enfermedades vesiculares, Leptospirosis, Fiebre Porcina Africana, Brucelosis, Toxoplasmosis.

**Enfermedades Respiratorias:** Bordetelosis, Haemofilosis, Pasteurelisis, Salmonelosis, Estafilococosis.

## 1.10 Prevención y control

Para la prevención y control de la EA es importante tomar un conjunto de medidas, dentro de las que se destacan por su importancia:

- La vacunación.
- Pesquisajes serológicos. (Seroperfiles).
- Mantener un programa permanente de desratización y desinfección.
- Evitar la introducción de animales provenientes de rebaños o áreas afectadas, así como alimentos, agua, transportes o utensilios que pudieran vehiculizar el virus.

- Establecer un período de cuarentena de 4 semanas en los animales de nueva incorporación para evaluar si aparecen Ac específicos contra el VEA.[67, 83, 110, 129, 130]

### **1.7.2 Vacunación**

El momento óptimo de vacunar se estima conociendo la cinética de los Ac maternos mediante la realización de seroperfiles. El objetivo es encontrar la ventana inmunológica donde el animal deja de estar protegido por Ac maternos y queda susceptible a la infección por el virus de campo.[133, 134]

La vacunación frente a la EA ha conseguido reducir su impacto económico, disminuye la aparición de signos clínicos y ayuda a la erradicación del VEA de las explotaciones porcinas. Reduce la transmisión del VEA ya que los vacunados excretan menos virus después de una infección por el virus campo, y aunque la vacunación no impide completamente la infección, ni el establecimiento de la latencia por el VEA, si reduce la diseminación tras la reactivación del virus. [30, 75, 135]

Entre las vacunas comerciales más conocidas tenemos: Suvaxyn (EUA), Omnivac (EUA), Omnimark (EUA), Novi- Porvac (Inglaterra), Ingelvac (Inglaterra), Akipor-6,3 (Alemania), Geskypur (Alemania), Hyoresp (Alemania).[122, 126, 124]

#### **Tipos de vacunas**

Vacunas inactivadas: Estimulan el desarrollo de Ac circulantes induciendo un cierto grado de protección. Esta vacunación, aparte de producir una cierta inmunidad humoral y celular, también disminuye el periodo de excreción del VEA después de retar a los cerdos con una cepa virulenta. La inmunidad que confieren es a menudo corta y necesita una segunda inyección. Los lechones nacidos de cerdas vacunadas con cepas inactivadas reciben una inmunidad pasiva fuerte y duradera.[24, 26,133]

Vacunas vivas atenuadas: Son obtenidas por pases, ya sea en fibroblastos de pollos, cultivos celulares, o por ingeniería genética. Se han aislado cepas de campo apatógenas (Bartha K-61, NIA-4), las que inducen una respuesta inmune parecida a la infección natural. Los Ac neutralizantes aparecen 2 semanas después de la vacunación. Las hembras vacunadas confieren a sus lechones una inmunidad calostrada inferior que disminuye más rápidamente en comparación con las inactivadas.[27, 30]

Vacunas con delección en el genoma: Permiten diferenciar los animales infectados de los vacunados, ya que los vacunados no producirán Ac frente a las gp deleccionadas. Para que esto ocurra debe de existir como mínimo una delección en algunas de las gp no esenciales.[131]

Vacunas de subunidades: Contienen componentes de las estructuras víricas que confieren protección inmunitaria. En el VEA estas porciones son algunas de las gp de la envoltura.[61]

Recombinantes vivos: Utilización de un microorganismo que actuaría como vector para expresar genes de otro microorganismo diferente.[51]

Vacunas de ADN: Utilización de una fracción de ADN purificado que contiene el gen de la proteína que induce una respuesta inmune protectora.[62]

### **1.7.2.1 Vacuna producida en Cuba**

En nuestro país, en los Laboratorios Biológicos Farmacéuticos se produce una vacuna elaborada en cultivo celular (suspensión de fibroblastos de pollo), inactivada con bromoetilamina y adyuvada con gel de hidróxido de aluminio y glicerina, ésta se preserva con timerosal. La vacuna se elabora con una cepa autóctona, obtenida a partir de un brote de la enfermedad en una unidad porcina de la provincia Habana (caso 1905 del año 1982) en un primer pase de fibroblastos de embrión de pollo del Laboratorio de Diagnóstico Central, actual Centro de Epizootiología y Diagnóstico Investigativo (CENEDI), perteneciente al Instituto de Medicina Veterinaria. (I.M.V).

Su período de validez es de 24 meses a partir de la fecha de elaboración y se debe almacenar en refrigeración entre 2-4 °C. Se recomienda en cerdas gestantes en las semanas 10 y 13 de gestación, en sementales cada 6 meses, y en cerditos a partir de los 30 días. La dosis a usar es de 5 mL por vía intramuscular (IM), y antes de inocularse el contenido vacunal debe agitarse el frasco. La vacuna esta contraindicada en animales enfermos, desnutridos, parasitados y hembras en las 2 últimas semanas de gestación. La duración de la inmunidad es de un año. [77, 128]

A esta vacuna se le realizan diferentes controles de calidad: esterilidad, inocuidad, eficacia inmunológica, inactividad, determinación de las características organolépticas, concentración de hidróxido de aluminio y determinación de timerosal.

Esterilidad: La vacuna debe estar exenta de agentes contaminantes o microorganismos viables, libre de micoplasmas, bacterias y hongos. Este parámetro es determinado en medios de cultivos adecuados para el crecimiento microbiano. Se realiza según el Procedimiento de Normas Operativas (P.N.O), código 8-03-003: Ensayo de esterilidad por el método directo.

Inocuidad: Se realiza según P.N.O, código 8-02-041

Eficacia inmunológica (potencia): Se realiza según P.N.O, código 8-02-042. Los animales empleados para esta prueba se les práctica eutanasia al finalizar la misma.

Inactividad: Se realiza según P.N.O, código 7-02-070: Prueba de inactividad de la vacuna Aujeszky. Los animales empleados para esta prueba se les práctica eutanasia al finalizar el mismo.

Determinación de las características organolépticas: Se utiliza el procedimiento sensorial para determinar apariencia y color, según P.N.O, código 08-02-006.

Determinación de la concentración de hidróxido de aluminio, se realiza según P.N.O, código 8-04-017, mediante método volumétrico. La concentración debe estar entre 5-10 mg/ mL.

Determinación del timerosal, se realiza según P.N.O, código 8-04-013. La cantidad final debe ser igual o menor de 0.1 mg/ mL.

Además se le determina el pH, el cual debe estar entre 7.2 – 7.6.

### **Requisitos de la vacuna inactivada cubana para armonizarse con la OIE**

El Manual Estándar de la OIE establece una serie de normas para que sean cumplidas por todos los países productores de vacunas. En estos momentos, se realizan reuniones anuales para lograr un objetivo único que es armonizar todas las fichas técnicas de vacunas elaboradas en las Américas. Cuba está incluida en este ambicioso proyecto, por lo que deben ser realizados estudios de inocuidad y potencia en cerdos susceptibles para lograr una vacuna armonizada con la OIE, con mayor calidad y mejores posibilidades económicas, esfuerzos en los que se enmarca el presente trabajo.

## **CAPITULO 2: MATERIALES Y METODOS**

### **2.2 Materiales**

#### **2.1.1 Equipos, cristalería y misceláneas.**

- Incubadora LP-103. (Hungría.)
- Centrífuga T-23. (Alemania.)
- Microscopio óptico de lente invertido. (ZEISS, Alemania.)
- Baño de María. BAC-01. (RETOMED, Cuba.)

- Refrigerador doméstico. (INPUD, Cuba.)
- Cámara de frío a  $-20^{\circ}\text{C}$ . (QUICKFREZ, Canadá.)
- Cámara de frío a  $-70^{\circ}\text{C}$ . (QUICKFREZ, Canadá)
- Horno .Drying Oven. 202-3. (China.)
- Báscula. DP. (Rusia.)
- Autoclave vertical GP. 360. (IM, Rusia.)
- Termómetro ( $35-42^{\circ}\text{C}$ ). (China.)
- Pipetas serológicas 0.5, 1 mL
- Micropipetas Eppendorf
- Tubos serológicos 12 x 75 mm
- Tubos de fondo plano 17-18 100 mm
- Frascos de 10, 25, 50, 100, 250,500 mL
- Erlenmeyer 250 mL.
- Mechero de gas.
- Gradillas
- Jeringuillas de 1,5 mL
- Agujas hipodérmicas.
- Tapones de goma sólidos.
- Lápiz cristalográfico.
- Agujas de California.
- Guantes de cirugía.
- Ropa bacteriológica (batas, gorros, tapabocas y botas).

#### **2.1.4 Medios nutritivos, productos biológicos y sistemas biológicos**

**Medio nutritivo:** Medio Esencial Mínimo (MEM A) (.SIGMA, EUA.)

Suero fetal bovino. (Hy Clone, Estados Unidos.)

**Productos biológicos:** Suero problema, procedentes de lechones susceptibles.

Virus de la EA (Antígeno) con títulos de  $10^{7.5}$  dosis infectante en cultivos de tejidos (DICT/50), calculado por especialistas del Departamento de Vacunas Inactivadas de los Laboratorios Viroológicos, Unidad Productiva # 7, según P.N.O, código 8-20-50. Titulación de suspensiones biológicas por los métodos estadísticos de Reed-Muench.

**Sistema biológico:** Fibroblastos de embriones de pollos (FEP), suministrado por el Departamento de Cultivos Celulares de los Laboratorios Viroológicos, Unidad Productiva # 7.

Elaborado según el P.N.O: Preparación de cultivo primario de embriones de pollos. Código 7-08-034.

### **2.1.3 Reactivos:** Tripsina. (SIGMA, EU.)

Etanol. (Cuba.)

Estreptomina 100 mg / mL de medio. (SIGMA, EU.)

Yodo.(Quimipur, España.)

Cristal Violeta. (Quimipur, España.)

### **2.1.4 Soluciones:**

Se preparan en el Departamento de Bioquímica de los Laboratorios Viroológicos, Unidad Productiva # 7, según los P.N.O correspondientes:

- Tripsina al 0.25 %. (código 7-8-011.)
- Solución salina tamponada con fosfatos (PBS). (código 7-08-025)
- Yodo al 1 %. (código 7-08-008.)
- Cristal violeta al 0.1 %. (código 7-08-006.)
- Etanol al 80 %. (código 7-08-010.)

## **2.2 Métodos**

### **2.2.2 Animales susceptibles**

Se realizó un muestreo estratificado al azar: Se utilizaron 69 cerdos sanos, 29 de la categoría lechones-lechonas y 40 puercas vacías para analizar la susceptibilidad de la especie porcina a la EA, los que representaron un tamaño de la muestra del 10 % de la masa de la unidad Genética Pomona, de la provincia La Habana. Los animales seleccionados no recibieron tratamientos previamente, específicamente antibióticos, corticosteroides u otros que pudieran suprimir la respuesta inmunológica a largo plazo. La susceptibilidad se determinó mediante la técnica de seroneutralización (SN).

Se utilizaron 7 ovinos susceptibles de 4 a 6 meses de edad, procedentes del Centro de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), con su correspondiente certificado sanitario, emitido por el I.M.V. para realizar la prueba de inocuidad y potencia a la vacuna del lote seleccionado, según la tecnología de producción cubana.

#### **2.2.2.1 Extracción de sangre y obtención del suero para la seroneutralización**

A los 69 cerdos se les realizó extracción de sangre. Con agujas californias, previamente esterilizadas, se les extrajo 5 mL de sangre sin anticoagulantes por la vena interna del ángulo del ojo. Esta fue depositada en tubos, los que se taparon y rotularon (# de identificación y # de muescas del animal). La sangre se mantuvo en reposo 2 horas a una temperatura de 37 °C, para

facilitar la retracción del coagulo y posteriormente a la temperatura de 2 - 8 °C durante toda la noche, para permitir su máxima retracción. Al día siguiente se decantó el suero y luego se centrifugó a 2500 r.p.m., durante 15 minutos. Todos los sueros se decantaron y se colocaron en tubos adecuados, fueron rotulados (# lote, fecha) y almacenados a - 20 °C.

### 2.2.1.3 Técnica de seroneutralización.

Los sueros se inactivaron en baño de María a 56<sup>0</sup> C durante 30 minutos, luego se dejaron reposar a 37 °C durante 2 horas y se almacenaron a -70 °C para su posterior utilización en el ensayo de neutralización.

El principio del ensayo de neutralización plantea que cuando un antisuero específico se añade al virus correspondiente, el virus pierde su capacidad infecciosa, resultando neutralizado. Para la demostración de la reacción es necesaria la utilización de un sistema biológico indicador. Se utilizó la técnica  $\beta$  para la seroneutralización, empleando diluciones ascendentes del suero con una constante dilución del virus. El título se expresa como la mayor dilución que neutraliza el virus en el 50 % de los tubos infectados.

Procedimientos:

- Se prepararon diluciones dobles seriadas del suero problema (1: 2, 1: 4, 1: 8)
- Se realizaron diluciones seriadas del virus 1: 10 hasta  $10^{-8.5}$ .
- Se añadió a los 0.4 mL del suero problema diluido 0.4 mL de las 100 dosis de virus ( $10^{-5.5}$ ) y se incubó a 37 °C durante 1 hora.
- Se decantaron los tubos de cultivos celulares de fibroblastos de embriones de pollo, excepto 9 de ellos, que se utilizaron para controles del medio de cultivo celular.
- Se inocularon 0.4 mL (mezcla suero problema diluido + la 100 dosis de virus  $10^{-5.5}$ ) a cada tubo de cultivo (2 tubos por suero) y luego se añadieron 0.7 mL de MEM-A y se incubaron a 37 °C durante 72 horas.

Paralelamente se montaron los siguientes controles:

- Control de cultivos celulares: Se tomaron 5 tubos de cultivo celular a los que se les realizó un cambio de medio nutritivo (MEM- A), utilizando un volumen de 1 mL. Por otra parte se tomaron 4 tubos de cultivo celular a los que no se les realizó cambio de medio de cultivo.
- Control del suero problema: Se inocularon 6 tubos de cultivo celular con la diluciones 1: 2, 1: 4 y 1: 8, sin virus de trabajo, utilizándose para cada tubo de cultivo celular 0.2 mL y agregándose 0.8 mL de medio nutritivo.

- Control de titulación: De las diluciones que se hicieron cuando se prepararon las dosis de trabajo se inocularon 2 tubos de cultivo de tejidos por cada una de las diluciones, utilizándose para cada tubo 1 mL de inóculo. Las diluciones empleadas fueron de  $10^{-5.5}$  a  $10^{-8.5}$ .

- Control de dosis: De la dilución de virus de trabajo con 100 dosis infectiva (DI) / mL de suspensión, se inocularon 2 tubos de cultivo de tejidos, utilizándose 0.2 mL para cada tubo, completándose el volumen con 0.9 mL de medio nutritivo.

Lectura: La observación con el microscopio óptico de lente invertido se realizó a las 24, 48 y 72 horas.

Se confeccionó y se anotó en el protocolo, según el modelo con cruces:

- (+) Efecto citopático en el 25 % de la monocapa.
- (+ +) Efecto citopático en el 50 % de la monocapa.
- (+ + +) Efecto citopático en el 75 % de la monocapa.
- (+ + + +) Efecto citopático en el 100 % de la monocapa.
- (-) No efecto citopático.

En la lectura de los controles se tomo en cuenta los siguientes parámetros:

- Control de cultivo celular: No debe haber cambios en la morfología y estructura de la célula. Si hay degeneración celular se debe repetir el ensayo.
- Control de titulación: Debe aparecer efecto citopático entre los parámetros 100 – 1000 DI. De estar por encima o por debajo de 100 – 1000 DI repetir el ensayo.
- Control de dosis: Debe aparecer efecto citopático en los tubos inoculados.
- Control del suero problema: De producirse degeneración en la monocapa no se pueden valorar los resultados obtenidos y habrá que inactivar dichos sueros.

### **2.2.2 Inmunógeno**

Vacuna inactivada Aujeszky (elaborada según la tecnología de producción de los Laboratorios Viroológicos, NC 26-12-81) con lote # 0409002.

### **2.2.3 Esquema de inmunización desarrollado en los lechones-lechonas susceptibles.**

Se utilizaron 45 animales susceptibles de la categoría lechones, de ambos sexos, con un peso entre 15-35 Kg, de 2-3 meses de edad, clínicamente sanos. Se formaron 3 grupos (1, 2, 3), cada

grupo tiene 15 animales. Estos grupos se dividieron en subgrupos (A, B, C, D, E, F). (Tabla # 1)

### **Grupo 1:**

Subgrupo A: Con una jeringuilla y aguja hipodérmica se inoculó 1 dosis de 5 mL de la vacuna seleccionada, por vía intramuscular (IM) a 11 animales y se repitió una 2da dosis a los 14 días posterior a la primovacunación,

Subgrupo B: Controles sin inocular (4 animales).

En el **grupo 2**, subgrupos C, D y en el **grupo 3**, subgrupos E, F, se desarrolló el mismo esquema de inmunización y se utilizó la misma cantidad de animales del grupo 1, subgrupos A, B.

Observaciones: Se tuvo en cuenta a la hora de aplicar la vacuna, de no limpiar la piel con excesivo alcohol, ni esterilizar la jeringuilla de forma química ya que esto suprime la respuesta inmunológica y los resultados pueden dar alterados.

### **2.2.3.2 Prueba de Inocuidad según Manual Estándar de la OIE**

Se empleo el método de observación (método sensorial), el que resulta fundamental en cualquier investigación. Su objetivo es el registro de hechos y factores básicos. Los hallazgos observados se anotaron rigurosamente y de forma inmediata.

Se observaron los lechones de los diferentes subgrupos formados previamente vacunados con 1 y 2 dosis y los controles, durante 14 días de forma diaria, para comprobar que no existieran síntomas compatibles con la EA, tales como síntomas nerviosos (temblores musculares, ataxia, nistagmos, coma), anorexia, fiebre, y muerte. Se les tomó la temperatura corporal a todos los subgrupos diariamente. Se observó la aparición de reacciones generales y locales. Se valoró, además, el comportamiento del peso.

### **2.2.3.4 Termometría**

A los lechones susceptibles utilizados para la prueba de inocuidad y eficacia inmunológica (Potencia) se les tomó la temperatura por vía rectal durante 1 minuto, por la mañana y por la tarde, después de la inoculación del inmunógeno.

La termometría fue registrada durante los días 2, 7 y 14 después de administrar la primovacunación y los días 16, 21 y 28 de la reestimulación vacunal, con el objetivo de determinar cualquier alteración en este parámetro fisiológico.

### **2.2.3.5 Determinación del peso corporal de los animales**

A los lechones susceptibles, que se les realizó la prueba de inocuidad y eficacia inmunológica, se les determinó el peso corporal utilizando una báscula. El pesaje se determinó los días

0,7,14,21 y 28 para valorar el comportamiento del parámetro medido, desde el primer día de la inoculación hasta el último día del ensayo.

#### **2.3.4 Prueba de Eficacia inmunológica (Potencia) mediante la técnica de SN**

A los lechones, a los 7 días posteriores a la primera vacunación y a los 14 días posteriores a la 2da vacunación se les realizó extracción de sangre. Con los controles se siguió el mismo procedimiento que para los vacunados.

Se empleó el mismo método de extracción de sangre y obtención de suero para la técnica de SN (2.2.1.1) y la misma técnica de SN (2.2.1.2). La dosis de trabajo utilizada (100 dosis) fue de  $10^{5,5}$  DICT 50 / mL. Se prepararon diluciones desde 1:2 hasta 1:16.

Lectura: No debe aparecer ECP en los tubos inoculados, lo que indica que la vacuna indujo anticuerpos neutralizantes, que impidieron al virus su efecto en las células de la monocapa.

#### **2.2.4.1 Respuesta humoral evaluada mediante la técnica de SN**

A los lechones susceptibles empleados en el ensayo se les extrajo sangre los días: 7, 14, 16,21 y 28, según el procedimiento descrito en el punto 2.2.1.1 y el 2.2.1.2 (Extracción de sangre y obtención del suero para la SN y técnica de SN, respectivamente) para comprobar la circulación de anticuerpos neutralizantes inducidos por la vacuna inactivada Aujeszky. Se determinaron los títulos medios geométricos (TGM) por cada día de las diferentes extracciones de sangre y se calculo el porcentaje de lechones con títulos de seroconversión mayores de 1/ 2.

#### **2.3.5 Prueba de Inocuidad y Potencia según tecnología de producción de la vacuna cubana**

##### **Inocuidad:**

Tamaño de la muestra: 1- 3 bulbos por lote de vacuna.

Se utilizaron 5 ovinos jóvenes susceptibles de 4 - 6 meses de edad y se vacunaron con 3 mL de la vacuna por vía intramuscular, los que se observaron durante 14 días.

Interpretación: Se considera satisfactorio, si concluido el período de observación los animales no presentan síntomas de la enfermedad de Aujeszky, ni trastornos atribuibles al producto vacunal.

##### **Potencia:**

Los 5 ovinos utilizados en la prueba de Inocuidad se revacunaron al concluir el tiempo de observación (14 días) con 2 mL de la vacuna por vía intramuscular.

Como testigos no vacunados se emplearon 2 ovinos de las mismas características y procedencia de los vacunados.

Transcurridos 14 días de revacunados los ovinos (vacunados y controles) se retaron con 100 DL<sub>50</sub> del virus de reto contenido en 1 mL por vía intramuscular y se observaron durante 14 días.

Interpretación: Los animales vacunados no deben presentar síntomas de la enfermedad o pueden presentar síntomas ligeros de la enfermedad (prurito y excitación nerviosa) y recuperarse. Además, debe sobrevivir el 80% de los mismos.

Los testigos (no vacunados) deben presentar a partir del quinto día prurito, excitación nerviosa, parálisis y muerte. En este caso, el 100 % debe morir.

#### **2.4 Análisis Estadístico:**

Se realizó el cálculo estadístico utilizando la Prueba t de Student para determinar si hubo o no diferencias significativas, respecto al peso de los vacunados y los controles. [112]

Se valoró si hubo o no diferencias significativas entre los vacunados con una dosis y los reestimulados, y entre los tres grupos experimentales vacunados con una dosis y los vacunados con dos dosis, respectivamente, mediante la Prueba G. [112]

## **CAPITULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIONES**

### **3.1 Determinación de la susceptibilidad de la especie porcina a la EA.**

En la Técnica de seroneutralización para determinar animales susceptibles al VEA, se comprobó que: durante las lecturas del ensayo al observarse la monocapa celular con el microscopio óptico de lente invertido se evidenciaron cambios histológicos, es decir efecto citopático (ECP) típico del VEA con apreciación de cambios morfológicos tales como redondamiento celular y formación de sincitios (fusión de las células) o policariocitos (células gigantes) en los tubos inoculados.

Los 69 animales muestreados fueron seronegativos de acuerdo a los criterios establecidos en la técnica de SN, anotándose los datos de las lecturas correspondientes a cada una de las muestras trabajadas. Las muestras no presentaron anticuerpos neutralizantes a la EA. La anotación final en el protocolo resultó que ocurrió efecto citopático en el 100% de la monocapa celular (++++). Es decir no hubo anticuerpos neutralizantes que impidieran al virus infectar las células, por lo que en la Unidad Genética Pomona de la provincia La Habana no hay circulación del virus campo, encontrándose animales susceptibles.

Moening et al.[73] refieren que la sensibilidad de la SN viene determinada por muchos factores como el tipo de cultivo celular, número de células, realización de la técnica en macro o micro ensayo, cantidad de virus empleado y principalmente el tiempo de pre-incubación de la mezcla virus-suero y la adición o no de complemento. Los índices de neutralización se incrementan con incubaciones más prolongadas de la mezcla virus-suero (24 horas a 37 °C). Estos requisitos fueron cumplidos en nuestro ensayo de SN, lo que nos permitió evaluar los resultados experimentales obtenidos.

Banks et al.[9] ,señalan que si el interés es conocer la situación epizootiológica la orientación de la técnica de SN está dirigida a la investigación del suero problema tomado de una sola extracción de sangre. Comprobados los anticuerpos neutralizantes se demuestra que el organismo ha tenido contacto con el agente etiológico, de ocurrir lo contrario no hay contacto con el VEA y no hay dinámica de circulación viral. La orientación para valorar la circulación del virus por la técnica de seroneutralización planteada por el autor se corrobora con nuestra investigación, al tomarse muestras de sueros obtenidos de una sola extracción de sangre.

Por otra parte, Horsch et al. [46]3, refieren que el estado de reacción de un efectivo (población) puede determinarse mediante investigación en serie de todos los animales o estudiando pruebas lo suficientemente representativas con la ayuda de ensayos serológicos. Es necesario determinar la frecuencia y magnitud de las pruebas para evaluar la situación de salud o comportamiento inmunitario de un efectivo, esto depende del volumen y estructura de la misma, de la exactitud de los métodos y las particularidades de la enfermedad que se investigue. En las investigaciones serológicas deben determinarse cuantitativamente la presencia o no de anticuerpos en los sueros muestreados, lo que permite evaluar la dinámica de circulación de agentes etiológicos y determinar la presencia o ausencia de susceptibilidad.

Kouba, V. [54]. En este sentido, plantea que los métodos de diagnóstico serológico (inmunodiagnósticos), constituyen los más frecuentemente utilizados para pesquisas operativas. Permiten descubrir los colectivos con y sin reacciones inmunológicas específicas. Los hallazgos de anticuerpos específicos, indican con seguridad la presencia de animales que han tenido contacto con el agente etiológico (investigación monoetiológica) y animales afectados. Las investigaciones serológicas, se utilizan para indirectamente buscar la ausencia o existencia de los agentes etiológicos específicos. De este modo permite el análisis de la situación epizootológica y conduce al descubrimiento de la realidad en la población animal y en su ambiente. Al respecto, dichas investigaciones tienen que poseer un sentido práctico, utilidad concreta, ser exactas, seguras, fidedignas y deben combinar los aspectos cuantitativos y cualitativos. Estas se emplean en investigaciones de creación activa de salud colectiva, en diferentes lugares, así como en un mismo lugar, área o unidad investigada y en un determinado período o momento dado con el objetivo de seleccionar animales susceptibles y animales sanos con un determinado fin.

Por otra parte, Margni et al.[65], afirman que al efectuar un diagnóstico de laboratorio fundado en estudios de explotación inmunológica se debe analizar y conocer todas las respuestas posibles que las infecciones con un virus determinado pueden originar. Ello plantea una permanente búsqueda de nuevos sistemas de estudio, que incluyen técnicas de detección de fácil aplicación y clara interpretación. La toma de muestras apropiadas en función del tipo de antígeno o anticuerpo que se desee detectar, es una exigencia esencial.

Coincidimos con los autores por lo que empleamos una muestra representativa de la población serológicamente investigada del 10%, que nos permitió determinar la susceptibilidad de la masa porcina.

Lorenzo[60], realizó un estudio serológico y viral de la EA en cerdos de Cuba, demostrando que en algunas unidades porcinas del país circulaba el virus de la EA y en otras zonas no circulaba el virus. Es decir, no hubo dinámica de circulación de anticuerpos mediante la técnica de SN, no existiendo diferencias en cuanto a las cepas encontradas y estudiadas. Al emplear la técnica de SN se obtuvieron títulos bajos (1/4 y 1/8), muy raras veces aparecieron títulos de 1/16 en áreas donde hubo prevalencia del virus. Por lo que llegó a la conclusión de que la cepa que circula en Cuba produce títulos de anticuerpos bajos en comparación con otras cepas que circulan en otros países del mundo. Nuestros resultados coinciden con el autor de esta investigación respecto a la presencia de animales susceptibles, en aquellas áreas donde no hubo prevalencia del virus de campo.

Nuestro estudio coincide también con López et al. [57,58] , que realizaron estudios de seroprevalencia del VEA en el estado de Yucatán en México en una granja de ciclo completo para detectar anticuerpos neutralizantes por técnicas de SN, Aglutinación en látex y ELISA. Apareciendo seronegatividad en los 132 animales muestreados, por lo que no hay circulación del VEA. Estos autores concluyeron que las técnicas serológicas empleadas son de un gran valor diagnóstico y se correlacionan, demostrando que la técnica utilizada por nosotros para determinar la seroprevalencia es adecuada.

### **3.5 Evaluación de la Inocuidad según Manual Estándar de la OIE.**

Los animales vacunados, observados durante 14 días de forma diaria, no presentaron síntomas compatibles con la EA, tales como síntomas nerviosos: temblores musculares, ataxia, nistagmos, coma y muerte. La temperatura corporal no excedió de los 37.6 °C en todos los subgrupos. No se observó la aparición de reacciones generales, ni locales. El comportamiento del peso, fue adecuado con el régimen de alimentación y edad de los animales. El peso promedio fue de 17-26 Kg. Los animales convirtieron de acuerdo a su categoría, según el manual de crianza porcina del 2000. Por lo que la vacuna empleada es inocua en los lechones susceptibles empleados, además es segura, ya que no apareció transmisión del virus vacunal en animales no vacunados, es decir al inocular una o dos dosis no se produjo efecto negativo, ni perjudicial respecto a los no vacunados, aún cuando están en contacto estrecho.

Trujillo [119], obtuvo la vacuna inactivada cubana contra la EA en cerdos y demostró su inocuidad, aunque realizó esta prueba en carneros.

Bass [11], plantea que los animales utilizados en la prueba de Inocuidad deben cumplir con los siguientes requisitos: estado sanitario, edad, peso y estado serológico (susceptibilidad), por cuanto cualquier factor ajeno a la prueba puede influir negativamente en los resultados obtenidos. El control biológico de las vacunas tiene como objetivo asegurar la calidad inmunogénica y eficacia del producto vacunal.

En este sentido, Horsch et al.[46], refieren que en la determinación de la inocuidad es indispensable las pruebas sobre los animales de explotación, es decir en la comprobación de esta prueba el empleo de la vacuna esta limitada al animal adecuado, o sea a la especie animal en que se haya de utilizar la vacuna en la práctica. En general, puede afirmarse que la comprobación debe llevarse a efecto en los animales más sensibles. La comprobación en el animal específico no puede dejarse de realizar. Esto se corrobora con lo planteado por la Farmacopea Europea [31], que plantea que las pruebas biológicas deben realizarse en los animales o especies a los que se dirige el producto vacunal o inmunizante. Al observarse los animales inoculados experimentalmente para una prueba de inocuidad, deben distinguirse los trastornos vacunales de las reacciones vacunales. Mientras que los primeros constituyen enfermedades que en condiciones normales no deben presentarse al emplear las vacunas, las segundas son fenómenos de acompañamiento, benignos o tolerados y no suponen una amenaza para el estado de salud de los animales vacunados. Coincidiendo con lo planteado por el Manual Estándar de la OIE [80], nuestra experimentación reafirma estos planteamientos al realizar la prueba de inocuidad en cerdos susceptibles a quienes va dirigido el producto vacunal. Las vacunas empleadas no provocaron reacciones, ni trastornos vacunales.

Horsch et al. [46], señalan que la inocuidad y eficacia de los preparados inmunizantes solo pueden evidenciarse por métodos biológicos de comprobación. Las pruebas químicas y de esterilidad e inactividad son de indudable valor y se relacionan de forma directa con la inocuidad del producto vacunal. Al emplear productos químicos en la elaboración de vacunas, se determinará la concentración final de estos. La esterilidad es de gran valor al evaluar la inocuidad pues de crecer microorganismos viables en las vacunas se producen reacciones generales y síntomas en los animales que hacen que estas no sean inocuas. La inactividad está estrechamente ligada a la inocuidad, ya que esta indica la inactivación del virus, de no inactivarse el mismo se pueden producir los síntomas característicos de la enfermedad. En nuestro experimento se empleó un lote satisfactorio en cuanto a la esterilidad, requisitos físicos químicos e inactividad. (Tabla # 2)

Margni [65], señaló que las pruebas de Potencia e Inocuidad permiten demostrar la antigenicidad de las vacunas. La inocuidad permite observar la modificación de la capacidad reactiva normal de los tejidos ante la inoculación de antígenos (vacunas), es decir las reacciones locales en el punto de inoculación o reacciones generales como alergias y choques anafilácticos. Como consecuencia de la interacción del antígeno con el anticuerpo *in vivo* pueden aparecer manifestaciones biológicas colaterales (necrosis, anafilaxia, etc.). Estas manifestaciones son consideradas como reacciones terciarias.

En nuestra investigación no hubo reacciones locales en el punto de inoculación o reacciones generales. No se observaron reacciones cutáneas mediadas por células, que pueden ocurrir en la epidermis y que conducen a la formación de eczema y dermatitis. Nuestra evaluación experimental también se contradice con Fracois et. al. [38], quienes señalaron que después de la administración de un antígeno puede ocurrir una hipersensibilidad inmediata debido a los anticuerpos Ig E ligada a la liberación de histamina y otras sustancias tensoactivas.

Merck [63], plantea que las condiciones de higiene durante la vacunación experimental es un factor determinante en el resultado de una prueba biológica. Los adyuvantes utilizados en vacunas aumentan la eficacia de la antigenicidad, pero pueden causar reacciones locales y afectar la inocuidad. Estos actúan reduciendo la velocidad de liberación del antígeno en el organismo y por tanto, prolongan la respuesta inmunológica. El hidróxido de aluminio, es un adyuvante inerte que forma depósitos conjuntamente con el antígeno formando normalmente un nódulo pequeño en sitio de inoculación, con la afluencia de macrófagos y linfocitos. Como resultado se producen títulos de anticuerpos por tiempos prolongados, simula a los generados por múltiples estimulaciones.

Por otra parte, Horsch et al.[46], señalan que tras la vacunación con hidróxido de aluminio las reacciones normales en el punto de inoculación pueden desaparecer a los 14 días o dejar una formación de pequeño tamaño, sin alterar el estado general del animal.

Taboada et al. [117], señalan que la glicerina, ejerce una función emoliente, en el acondicionamiento del área indicada para la aplicación de medicamentos biológicos – farmacéuticos. Tiene propiedades humectantes lo que facilita su absorción. Algunos autores, como Armenteros y Mebelin (1988), plantean que por encima del 12 %, provocan efectos tóxicos y reacciones colaterales en los animales.

En este sentido, el Manual Estándar de la OIE [80], plantea que las reacciones locales anormales asociadas principalmente al uso de adyuvantes son de dos tipos: alérgicas e inflamatorias. Las reacciones inflamatorias son más complicadas, observándose necrosis o supuración, esto depende de la naturaleza del adyuvante usado y las condiciones de higiene de la vacunación. Los adyuvantes pueden inducir variedades de efectos como: degeneración, granulomas, fibrosis y absedación. Es necesario observar el sitio de la inyección al inocular el antígeno en combinación con adyuvantes. Los adyuvantes hidróxido de aluminio y glicerina, empleados en la vacuna utilizada por nosotros, no causaron ninguna de las reacciones señaladas anteriormente, no afectándose la Inocuidad.

Van Oirschot et al.[130], afirman que con una segunda dosis vacunal (dosis de recuerdo) se refuerza la inmunidad. Pero se pueden producir reacciones anafilácticas a componentes propios del antígeno vacunal o productos químicos (adyuvantes, preservos y otros), usados en la elaboración de las vacunas.

Al respecto Horsch et al.[46], plantean que algunos medios químicos usados en las vacunas inactivadas suelen formar con las proteínas del antígeno (vacuna) complejo de propiedades antigénicas completamente alteradas, específicamente al usar una dosis repetida de vacunas, lo que ha provocado reacciones de hipersensibilidad en algunos animales. Al realizar la reestimulación experimental reforzamos la inmunidad, pero no observamos las reacciones descritas por estos autores.

El Código Federal de Regulaciones (CFR) [21], Manual Estándar de la OIE [79], plantean que la prueba de inocuidad se efectúa con el fin de demostrar que las vacunas utilizadas en la prevención de la EA son inocuas para los cerdos. El lote de vacuna se considera satisfactorio cuando los lechones vacunados con 1 o 2 dosis, no presentan síntomas, ni reacciones atribuibles a la vacuna.

La Farmacopea Europea [31], plantea que se deben utilizar animales con un peso corporal entre 15 hasta 35 Kg. Se debe valorar la ganancia de peso, no debe alterarse este parámetro, la ganancia diaria de peso debe considerarse de 0.5 libras en un régimen de tenencia y manejo zootécnico óptimo. Los animales usados en el ensayo inmunogénico y la inocuidad se les toma la temperatura por vía rectal de 24 a 48 horas después de la vacunación para comprobar posibles reacciones generales.

Por otra parte, el Manual Estándar de la OIE [80], plantea que las reacciones adversas están determinadas por cambios en la temperatura, peso y talla en los vacunados y el grupo control. La curva de peso de los lechones vacunados no debe diferir de forma significativa a la de los controles, debe valorarse la ganancia de peso o aumento corporal. Se realizará pesaje los días 0, 7 y 14 después de la primera vacunación.

En nuestras pruebas no hubo alteración de estos parámetros: peso y temperatura corporal, Los animales utilizados tenían un peso entre 15-35 Kg. y la temperatura promedio se comportó dentro del parámetro normal (37.5 °C). La conversión del peso corporal fue entre 0.5 y 0.7 libras diarias. No hubo diferencias significativas entre el peso de los vacunados y los controles ( $p > 0,05$ ). (Tablas #3 y 4)

### 3.6 Evaluación de la eficacia inmunológica (Potencia) mediante la técnica de SN.

En la Técnica de seroneutralización, para determinar eficacia inmunológica, se comprobó que: durante las lecturas del ensayo al observarse la monocapa celular con el microscopio óptico de lente invertido no se observaron cambios histológicos, es decir no apareció efecto citopático (ECP) típico del VEA. Ello indica que tras la vacunación aparecieron anticuerpos neutralizantes que no permitieron al VEA desarrollar su efecto sobre las células de la monocapa, las que mantuvieron su integridad estructural y morfológica.

Al realizar la prueba de eficacia inmunológica (potencia) con 1 dosis vacunal y 2 dosis vacunales, se obtuvieron mejores resultados con el esquema de vacunación empleado con 2 dosis vacunales, donde los títulos de anticuerpos neutralizantes fueron entre 1/4 y 1/8. Los títulos obtenidos con 1 dosis vacunal fueron entre 1/2 y 1/8. Los controles sin inocular fueron seronegativos 1/2. En nuestras condiciones los títulos 1/2 se consideran negativos y a partir de 1/4 positivos. (Tablas 5-16 y gráfico # 1)

Francois et al.[38], refieren que los anticuerpos antiviral disminuyen su virulencia, reflejada en su efecto citopático, e inhiben el desarrollo viral. También puede ponerse a prueba la capacidad de los anticuerpos para inhibir la hemoaglutinación viral que suele obtenerse al agregar determinados eritrocitos. La neutralización viral se produce bajo la acción conjugada del anticuerpo y el complemento. Esta acción neutralizante se puede explicar por una estabilización de los complejos anticuerpos viriones formados al principio de la inmunización, por una lisis de la envoltura viral, por una facilitación de la fagocitosis de los virus, por los polimorfonucleares en el seno de los cuales no se multiplican y por lo tanto no tienen la posibilidad de infectar las células que le son sensibles, por una citólisis en presencia del complemento con otras células blanco infectadas por el virus, que tienen un antígeno viral en su membrana.

Briare, [16] y Banks et al.[9], señalan que la técnica de SN resulta útil al detectar anticuerpos neutralizantes que son producidos por el virus campo o por todos los tipos y clases de vacunas. Por otro lado, Merck [63], demuestra que la SN es un método que permite evaluar la inmunidad humoral al detectar anticuerpos neutralizantes en los sueros muestreados, constituyendo una técnica de gran valor diagnóstico.

Según plantea Sánchez et al.[127], la técnica de SN es muy utilizada para la confirmación de casos positivos en áreas no sometidas a programas vacunales. Sin embargo, no es posible utilizarla cuando se emplean programas vacunales, incluso cuando se utilizan vacunas con marcadores serológicos. Esta técnica detecta anticuerpos neutralizantes que son producidos tanto por el virus de campo como por todos los tipos y clases de vacunas.

El Manual de la OIE [80], plantea que la SN es la técnica de referencia para la detección de anticuerpos neutralizantes de virus. Es considerada como el estándar de oro, pues permite valorar la potencia o eficacia inmunológica de las vacunas.

Los resultados obtenidos en nuestra experimentación, empleando la técnica de SN permiten corroborar lo planteado por estos autores y por la Norma de la OIE, en cuanto al criterio de eficacia inmunológica (potencia) de la vacuna inactivada Aujeszky y con respecto a la seroprevalencia para determinar animales susceptibles. Se confirma así lo planteado por Sánchez, pues la granja investigada en nuestro estudio no estaba expuesta a la vacunación.

Margni [65] y Francois et al.[38], plantean que las defensas inmunológicas del organismo responden al estímulo inmunogénico produciendo anticuerpos, activando la inmunidad mediadas por células o ambos. El estímulo se consigue administrando un antígeno (vacuna), que puede provocar el desarrollo de una respuesta inmunológica específica solo frente al agente inductor. La eficacia inmunológica o potencia permite determinar la presencia de agentes inmunológicos (anticuerpos) circulantes en sangre mediante pruebas serológicas. Para que una sustancia pueda actuar como antígeno, aún cuando ella reúna todas las condiciones para la antigenicidad, es indispensable que su concentración sea la óptima cuando se inocula al huésped susceptible, pues pequeñas dosis podrían ser inefectivas y un exceso podría actuar como inhibidor.

En nuestra investigación utilizamos una dosis adecuada de antígeno capaz de inducir anticuerpos, con un título de  $10^{7.5}$  DICT 50. /mL.

La mayoría de los antígenos al ser inoculados, inducen la formación de anticuerpos, pero el tipo de respuesta inmune en el caso de una inoculación de una primera dosis de antígeno, sin inmunidad base (respuesta primaria) difiere de una segunda inoculación (respuesta secundaria). Los hechos experimentales demuestran que cuando un antígeno penetra por primera vez en el receptor de un hospedero susceptible la concentración de anticuerpos aumenta de una forma progresiva hasta un nivel determinado, para descender luego más o menos rápidamente, según los casos. Cuando el animal recibe dos o más estímulos la respuesta difiere totalmente de la descrita. En la reestimulación se observa inmediatamente después de la inyección del inmunógeno, una ligera disminución de los anticuerpos circulantes como consecuencia de la complejación de una parte de ellos con el antígeno inyectado. Es necesario destacar que en la respuesta secundaria desempeña un papel muy importante el tiempo transcurrido entre el primer y el segundo estímulo. (Gráfico # 2)

En este sentido, Fainboim et al.[33] y Meyer [71], señalan que a nivel humoral cuando el animal se expone a un antígeno por primera vez esto da lugar a una estimulación de linfocitos T, de tipo Th2 (h-helper-colaboradores), que a su vez activan y diferencian a los linfocitos B, produciéndose una respuesta primaria de anticuerpos. Aparecen de forma lenta anticuerpos Ig M, poco después de Ig G y luego, el resto de las inmunoglobulinas. Ante una exposición posterior al mismo antígeno, se produce una respuesta secundaria caracterizada por: aparición más rápida de anticuerpos con predominio de la Ig G frente a la Ig M, títulos más altos o más estables y anticuerpos con más afinidad por el antígeno.

Nuestros resultados coinciden con estos autores, pues se produce una respuesta primaria y los niveles de anticuerpos aumentaron después de una reestimulación, expresándose entre 1/4 y 1/8. (Gráfico # 1)

El CFR [21], plantea que los controles utilizados en la prueba de potencia deben comportarse seronegativos 1/2. Los animales vacunados con 1 dosis y 2 dosis, al menos 4 animales de 5 vacunados deben tener títulos de SN igual o mayor de 1/8 (positivo).

Este criterio cambió en el año 2004, según el Servicio de Inspección Sanitario de Plantas y Animales (APHIS) [5] y el CFR [22], que plantean que los controles deben ser seronegativos 1/2, los vacunados con 1 sola dosis y revacunados (2 dosis) al menos 4 de los 5 vacunados deben tener títulos iguales o mayores de 1/4 (positivos).

Los resultados obtenidos en nuestro ensayo oscilaron entre 1/4 y 1/8, para las dos vacunaciones en los tres grupos de animales. Los animales controles fueron seronegativos, coincidiendo con lo estipulado por APHIS y por lo planteado por la OIE.

Zuckerman et al. [139], señala que la respuesta de anticuerpos que se induce como resultado de la vacunación es de gran magnitud. Los seroperfiles son muy útiles cuando se quiere evaluar el grado de protección de los animales antes una eventual exposición al virus de campo. Sin embargo, hay que tener en cuenta que para el virus de la EA la información cuantitativa no puede ser indicativa totalmente del estado de protección de los animales, demostrándose que los mecanismos de naturaleza celular pueden ser de gran relevancia en el desarrollo de la inmunidad protectora. El grado de protección in vivo frente al virus de la EA, está condicionado tanto a la capacidad de respuesta humoral como celular del animal. De ahí que la valoración exclusivamente humoral proporcionada por los seroperfiles debe interpretarse con precaución puesto que niveles elevados no necesariamente implican animales bien protegidos, ni niveles bajos ausencia de protección. De cualquier forma, la cinética normal de aparición de respuestas inmunes en el animal, con una aparición temprana de anticuerpos, seguida de la respuesta específica celular, indica que en animales con presencia de anticuerpos específicos, los mecanismos inmunes necesarios para generar protección frente a la infección pueden estar presentes. Por lo tanto, la valoración mediante los métodos serológicos de anticuerpos es indicativa de cierto grado de protección en los animales, siendo en particular la valoración de los anticuerpos neutralizantes más representativos de la capacidad de la respuesta protectora. La SN es en este caso la técnica más adecuada para valorar este tipo de anticuerpos.

Molitor y Thawley [75], Wittman [138], señalan que las vacunas inactivadas producen cierta inmunidad celular y humoral, también disminuyen el período de excreción del virus después de retar a los cerdos con una cepa virulenta.

Por otro lado, Gutekunst y Pirtle [42], Molitor y Thawley [75] y Mercé Soler [123], plantean que las vacunas inactivadas generalmente estimulan el desarrollo de anticuerpos circulantes, induciendo cierto grado de protección.

Margni et al.[65], con relación a lo anterior refieren que una vacuna clásica del virus herpes inactivada, solo será capaz de inducir eficientemente anticuerpos contra antígenos de superficie viral (neutralizantes) y muy poco o nada contra estructuras antigénicas internas. La medida de los niveles de anticuerpos alcanzados en los animales inoculados, puede expresar el estado inmune, por ser estos anticuerpos los responsables de la protección. En este sentido, Martin et al.[124], argumentaron que las vacunas inactivadas, inducen respuestas predominantemente de tipo humoral.

Al respecto, Lorenzo et al.[59], demostraron que en nuestras condiciones con el empleo de la cepa autóctona la vacuna inactivada induce de forma general títulos bajos. A pesar de la baja titulación, nuestra vacuna según datos obtenidos por el CENEDI, desde 1996-2003 ha logrado disminuir la prevalencia de la EA en nuestra masa porcina. Ello indica que la vacuna inactivada elaborada por LABIOFAM logra disminuir los índices epizootiológicos, reduciendo así el impacto económico que produce la enfermedad.

Mengeling y Pirtle [69], plantearon que los animales vacunados con vacunas inactivadas suelen dar títulos de 1/2 a 1/32 y los infectados de 1/256. Es decir, suelen aparecer títulos bajos con respecto a otros tipos de vacunas, pudiera influir también en ello las características de la cepa vacunal utilizada. La cepa salvaje circulante en nuestro medio, induce niveles de anticuerpos entre 1/4 y 1/16 y en la vacuna inactivada, los niveles oscilan entre 1/4 y 1/8, lo que difiere con este autor, pues los títulos son más bajos que los expresados en su estudio.

### **3.6.1 Evaluación de la respuesta humoral mediante SN.**

Los lechones susceptibles vacunados elaboraron anticuerpos ante la presencia del antígeno contenido en la vacuna (respuesta humoral) y fue evaluada la presencia de los mismos por SN. Los títulos medios geométricos obtenidos en nuestros resultados fueron entre 1/2 - 1/8. A los 16 días aparece una complejación por la interacción antígeno- anticuerpo (Gráfico # 2).

Fainboim et al. [33], señalan que la formación de anticuerpos aparece a los 5 días post inoculación del antígeno, primeramente aparecen las Ig M y luego entre 10-15 días las IgG, que por un mecanismo de inhibición inhiben a las IgM.

Horsch et al. [46], 1984, señalan que tras la aplicación de vacunas inactivadas los anticuerpos neutralizantes fueron detectados al 5<sup>to</sup> día aunque la cuantía de anticuerpos (U/mL) fue muy baja con respecto a la encontrada los días 10 y 15 posvacunación.

Sin embargo, Romero et al. [122], afirman que los anticuerpos específicos frente a una infección o vacunación con el VEA tardan en aparecer de 7 a 10 días. Corroboramos lo planteado por Fainboim y Horsch, ya que a los 7 días ya había anticuerpos neutralizantes contra el VEA y diferimos de lo planteado por Romero et. al 2003.

Sclesinger et al. [109], determinaron la respuesta humoral mediante la SN a la vacuna Ingelvac Aujeszky MLV, en lechones de 10 semanas de edad. Los grupos vacunados mostraron seroconversión a los 14 días posvacunación.

Se considera que los animales han seroconvertido si los títulos exceden de 1/2, determinando para ello los títulos medios geométricos de cada grupo en cada período de extracción. A los 7 días apareció la respuesta de tipo humoral. Los resultados obtenidos por nosotros son similares en cuanto al procedimiento y la seroconversión a los 14 días, así como en relación a la respuesta humoral esperada.

Gómez et al. [121], evaluaron la respuesta humoral de la vacuna inactivada cubana contra la EA, mediante SN y obtuvieron títulos entre 1/2 a 1/16. En nuestro experimento, la respuesta humoral fue similar a la evaluada por estos autores (Gráfico # 2 y 3).

### **3.7 Resultados de la prueba de Inocuidad y Potencia según tecnología de producción de la vacuna cubana**

#### **Inocuidad.**

El lote de vacuna utilizado en el estudio resultó inocuo, ya que los animales vacunados no presentaron síntomas de la enfermedad de Aujeszky y los testigos murieron.

#### **Potencia:**

Los animales vacunados no presentaron síntomas de la enfermedad y sobrevivieron el 100%. Los testigos (no vacunados) presentaron a partir del sexto día prurito, excitación nerviosa, parálisis y muerte a los 12 días.

La prueba de inocuidad y potencia en carneros realizada en nuestra investigación según la tecnología de producción cubana (NC 26-12-82) [77], demuestra que el lote de vacuna empleado fue satisfactorio. En la prueba de inocuidad los 5 carneros inoculados no presentaron síntomas de la EA, ni reacciones adversas atribuibles al producto de ensayo. En el ensayo de potencia los 5 inoculados no presentaron síntomas de la EA, lo que representa un 100% de supervivencia, los 2 testigos inoculados murieron para un 100% de letalidad.

Gómez et al.[121], realizaron pruebas de potencia en carneros y lechones a la vacuna inactivada Aujeszky, utilizando el procedimiento según PNO. Código 80242 (Prueba de Potencia), obteniendo el siguiente resultado:

Vacunados			Testigos	
Especie	Cantidad	Porcentaje de supervivencia	Cantidad	Porcentaje de letalidad
Porcinos	10	100	5	90
Carneros	40	100	16	87

Realizaron, además, pruebas de potencia a los lechones susceptibles mediante seroneutralización arrojándose los siguientes resultados:

Negativos	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	Total
91	113	186	39	19	2	0	0	0	450

Nuestros resultados coincidieron con Gómez et al.[121], pues en nuestro ensayo, la prueba de Potencia en carneros fue 100 % satisfactoria. En lechones susceptibles los títulos de anticuerpos oscilaron entre 1/4 y 1/8, por lo que la prueba de potencia fue igualmente satisfactoria, no siendo necesario realizar el reto con la cepa Phylaxia (cepa de referencia), según lo planteado por la OIE [80]. Se demostró que en nuestras condiciones se puede evaluar el criterio de potencia por SN. (Tablas 5-16).

La armonización del lote 0409002 de la vacuna Aujeszky inactivada, según las normas del Manual Estándar de la OIE, en cuanto a los criterios de inocuidad y potencia, nos permitió mejorar la calidad y con ello elevar las posibilidades de comercialización. Se valoró que este control de calidad en lechones susceptibles, ahorra \$ 9125.50 MN anualmente. (Valoración económica, anexo).

#### **Conclusiones:**

- Se determinó mediante la técnica de seroneutralización que la unidad genética “Pomona” de la provincia La Habana, no presenta circulación viral, al no encontrarse anticuerpos neutralizantes en los sueros muestreados, por lo que tiene animales susceptibles.

- La evaluación de la inocuidad del lote 0409002 de la vacuna Aujeszky inactivada en cerdos susceptibles, resultó satisfactoria, según lo planteado por las normas internacionales del Manual Estándar de la OIE.
- Con el empleo de un esquema de inmunización en cerdos susceptibles con dos dosis del lote 0409002 de la vacuna Aujeszky inactivada, se demostró su eficacia inmunológica en las pruebas de potencia, y el cumplimiento de los requisitos de la OIE al alcanzar mediante la técnica de seroneutralización títulos de 1/4 -1/8.
- Se logró armonizar el lote 0409002 de la vacuna Aujeszky inactivada, atendiendo a los criterios de inocuidad y potencia, según las normas internacionales establecidas por el Manual Estándar de la OIE, lo que mejora su calidad y ahorra 9125.50 MN anualmente.

#### **Recomendaciones:**

- Realizar los controles de calidad de la vacuna inactivada Aujeszky, según los criterios de inocuidad y potencia, por las normas internacionales de la OIE.
- Aplicar el esquema de inmunización con dos dosis de la vacuna Aujeszky inactivada en cerdos susceptibles para el desarrollo del ensayo de potencia mediante seroneutralización.

### **Bibliografias:**

1. Afschar A, Dulac GC. Immunoperoxidase phaque staining for the detection of Pseudorabies virus. *Can.J.Vet.Res.*1986; 50: 118-119.
2. Afschar A, Wright P, Myers DJ, Bouffard A, Dulac GC. Specificity of the indirect enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Pseudorabies virus antibodies in pig exposed to Bovine Herpes Virus. *Am. J. Vet. Res.* 1987; 48:1461-64.
3. Allan GM, McNulty MS, Mc Cracken RM, McFerran JB. Rapid diagnosis of Aujeszky's disease in pigs by Immunofluorescence. *Res. Vet. Sci.* 1984; 36: 235-9.

4. Allan GM, McNulty MS, Todd D, McFerran JB. The rapid detection of Aujeszky's disease virus in pigs by direct immunoperoxidase labelling. *Vet. Microbiol.* 1985; 10: 481-6.
5. Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS). Pseudorabies Vaccine. 2004: 666-667.
6. Arias M, Moyano M, Escribano MJ, Sánchez-Vizcaíno JM. Evaluation of two ELISA kits for the detection of Aujeszky's disease antibodies in pigs. *Vet. Res.* 1992; 131: 391-3.
7. Arias M, Pastor MJ. Diagnóstico de la Enfermedad de Aujeszky. *Fichero Porci.* 2003; 6: 63-76.
8. Bahnemam HG. Inactivation of viral antigens for vaccine preparation with particular reference to the application of binary ethylenimine. *Res. Vaccine.* 1990; 8:299-303.
9. Banks M, Cartwrights H. Comparison and evaluation of four serological tests for detection of antibodies to Aujeszky disease virus. *Vet. Res.* 1983; 113: 38-41.
10. Banks M. Rapid ELISA for Aujeszky's disease eradication. *Vet. Res.* 1983; 23: 94-95.
11. Bass SM. Control Biológico de Vacunas. *Rev. Vet. Chile.* 1987;19:11-14
12. Beran GW, Davies GB, Arambulo PV, Will LA, Hill TH, Rock DL. Persistence of Pseudorabies virus in infected pigs. *JAVWA.* 1980; 176: 998-1000.
13. Bitsch V, Ekildsen M. Complement dependent neutralization of Aujeszky's disease virus by antibody. *Topics Veterinary Medicine and Animal Science. The Netherlands.* 1982; 41:51-56.
14. Bofill V P, Rivas CA, Sánchez, RW, Montañés GC, Martínez MA, Quincoces FT, González RL, Fustes ME.. *Manual de enfermedades infecciosas. Tomo II. ISCAH. Editorial ENPES,* 1989: 212-225.
15. Bolin CA, Bolin SR, Kluge JP, Mengeling WL. Pathologic effects of intrauterine deposition of pseudorabies virus on the reproductive tract of swine in early pregnancy. *Am. J. Vet. Res.* 1985; 46: 1039-42.
16. Briare, JR; Meloen, RH; Barteling, SJ: An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibody against Aujeszky's disease in pig sera. *Zentrabl. Veterinärmed. Reihe, B,* 1979; 26: 76-81.
17. Card JP, Enquist LW. Neurovirulence of Pseudorabies virus. *Res. Neurobiology.* 1995; 9: 137-162.
18. Carrasco CA, Mendoza ES. Interacción del virus de la pseudorabia con bacterias involucradas en las afecciones respiratorias del cerdo. *Rev. Vet. México.* 1991; 22: 23-27.
19. Castro JM. El virus de la enfermedad de Aujeszky. *Fichero Porci.* 2000; 8: 23-35.
20. Chinsakchai S, Monitor TW. Immunobiology of pseudorabies virus infection in swine. *Res. Vet. Immunol. Immunopathol.* 1994; 43:107-116.

21. Código Federal de Regulaciones. Título 9 (CFR. 9). Enfermedad de Aujeszky. 2000.
22. Código Federal de Regulaciones. Título 9 (CFR. 9). Enfermedad de Aujeszky. 2004.
23. Consejo Mexicano de Porcinocultura (CMP). Desarrollo porcicola: El riesgo de movilización de animales, productos y subproductos dentro de zonas libres de Aujeszky. 1994.
24. Consejo Mexicano de Porcinocultura (CMP). Desarrollo porcicola: Las vacunas contra la enfermedad de Aujeszky. 1996.
25. De Bruin MG, De Visser YE, Kimman TG, Bianchi AT. Time course of the porcine cellular and humoral immune responses in vivo against pseudorabies virus after inoculation and challenge: significance of in vitro antigenic restimulation. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1998; 65: 75-87.
26. De Leeuw PW, Oirschot V. Vaccines against Aujeszky's diseases: Evaluation of their efficacy under standardized laboratory conditions. *Vet. Quaterly.* 1985; 7:191-97.
27. Dedek L, Jerabek J. Experience with preparation of inactivated vaccine against Aujeszky's disease. *Inf. Vet. Brno.* 1981; 50: 221-7.
28. Díaz DEE. Recientes avances en el conocimiento del virus de la enfermedad de Aujeszky y sus aplicaciones en la erradicación de la enfermedad. *Rev. Med. Vet.* 1988;5: 393-404.
29. Dresser DW. *Handbook of Experimental Immunology.* 4th Ed. Ed. Weir D.M. 1986; 2:60-70.
30. Eiras A, Puentes E, Regueiro BJ. Vacunas frente a la enfermedad de Aujeszky. *Fichero Porci.* 2000; 8: 37-42.
31. European Pharmacopoeia for Aujeszky's Disease Vaccine (Inactivated) for pigs. 2000
32. Ezura K, Usami Y, Tajima K, Komaniwa, Nagai S, Narita M, Kawashima K. Gastrointestinal and Skin lesions in piglets naturally infected with pseudorabies virus. *Res. Vet. Diagn. Invest.* 1995; 7: 451-455.
33. Fainboim L, Satz LM. *Introducción a la inmunología humana.* Talleres Grafica Patricia. SRL. 3ra Ed. Argentina. 1995: 15-292.
34. Falser N, Bondtlow I, Haus M, Wolf H. Detection of pseudorabies virus DNA in the Inner Ear of Intranasally Infected Balb/c Mice with Nucleic Acid Hybridization *in situ*.. *J. Virol.* 1986; 57: 335-339.
35. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.* Tomo I y II. 6ta. Ed. 1994; 1522-1621.
36. Fenner FJ, Gibbs EPJ, Murphy FA, Rott R, Studdert M, White DO. *Veterinary Virology.* 2<sup>nd</sup> Ed. Academic Press Inc. EU. 1993: 3-368.

37. Ford R. Vaccines and vaccinations: Issues for the 21<sup>st</sup> century. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 1998; 20 (8): 19-24.
38. Francois B, Arameas S, Bach AM, Benveniste J, Capron A, Preval C, Fauve RM, Griscelli C, Lagrange PH. *Inmunologia*. Editorial Limusa S.A. México. 1ra Ed. 1984: 125-663.
39. Fuentes M, Pijoan C. Pneumonia in pigs induce by intranasal Challenge exposure with pseudorabies virus and *Pasteurella multocida*. *Am. J. Vet. Res.* 1987; 48: 1446-48.
40. Gillighan, Silim y Venne. Validación de pruebas serológicas para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. *Rev. Ciencia y Técnica. OIE.* 1998; 2(17): 507-526.
41. Gomez TO. Características generales. Sintomatología y patología de la enfermedad de Aujeszky. *Fichero Porci.* 1992; 8: 11-20.
42. Gutekunst DE, Pirtle EC. Humoral and cellular immune responses in swine after vaccination with inactivated pseudorabies virus. *Am. J. Vet. Res.* 1979; 40: 1343-46.
43. Hebert WJ. *Handbook of Experimental Immunology*. 3<sup>rd</sup> Ed. Ed. Weir D.M. 1979; 3: 7-15.
44. Hernández PVM. Manual teórico de Virología. ISCAH. ENPES. 1987:1-358.
45. Hill H. Interpretation of serological results of some important swine diseases. *Am. J. Vet. Res.* 1988; 10: 979-85.
46. Horsch F, Buchwalder R, Hoffman F, Horsch BK, Funchs W, Heider G, Hieper TH and Meinsinger H. *Inmunoprofilaxis de los animales domésticos*. Editorial Acribia S.A. España: 30-293.
47. Iglesias JG. Estudios sobre los métodos de transmisión del virus de la enfermedad de Aujeszky. 1987. *Rev. Vet. Cuba*; 4: 81-84.
48. Jubb KVF, Kennedy PC. *Patología de los animales domésticos*. Tomo II. Editorial Ciencia y Técnica. 1994:493-505.
49. Kersten A. Enfermedad de Aujeszky y su erradicación. *Rev. Anaporc.* 1990; 89:41-44.
50. Kimman TG, De Bruin TMG, Voermans JJM, Peeters BPH, Bianchi AT J. Development and antigen specificity of the lymphoproliferation response of pigs to pseudorabies virus: dichotomy between secondary B- and Tcell responses. *Immunol. Vet. Microbiol.* 1995; 86: 372-378.
51. Kit S, Kit M and Pirtle EC. Attenuated properties of thymidine kinase negative deletion mutant of pseudorabies virus. *Am. J. Vet. Res.* 1985; 46: 1359-67.
52. Kluge JP, Beran GW, Hill HT, Platt KB, Lemman AD, Mengeling WL. *Diseases of swine*. 1992. 7a. Edition. Edit. Iowa State University. Pres: 312-23.

53. Komaniwa H, Marakabe T, Fukuda M, and Ogawa T. Levels of passive antibodies against Aujeszky disease virus in piglets derived from infected sows. *Jpn. Vet. Sci.* 1986; 48: 633-35.
54. Kouba V. *Epizootiología General*. Ed. Pueblo y Educación. 2da Ed. 1987: 430-85.
55. Kritas SK, Pensaert MB, Navwynck HJ, Kyriakis SC. Effect of the concentration of maternal antibodies on the neural invasion of Aujeszky's disease virus in neonatal pigs. *Vet. Microbiol.* 1997; 55:29-36.
56. Larski Z. *Virología para veterinarios*. 2da Edición. Prensa Médica Mexicana 1989: 278.
57. López A, Álvarez F, Rodríguez BJC. Control y erradicación de la enfermedad de Aujeszky en un sistema múltiple de tres sitios de producción. *Revista. Veterinaria. México.* 1997; 28 (2): 4-8.
58. López A, Álvarez F, Rodríguez BJC. Seroprevalencia del virus de la Enfermedad de Aujeszky en cerdos finalizados en una granja de ciclo completo en el estado de Yucatán. *Rev. Biomed.* 1997; 8 (4): 8-12.
59. Lorenzo RF, Gomez L, Gainza N, Perez JE. Proyecto de investigación de la obtención de la vacuna trivalente contra las enfermedades de Aujeszky- Encefalomiocarditis-Leptospira. LABIOFAM.2002.
60. Lorenzo RF. Estudio serológico de la enfermedad de Aujeszky en cerdos de la Republica de Cuba. Informe Técnico Nacional. IMV. 1983.
61. Maes K and Schuts BS. Evaluation in swine of subunit vaccine against pseudorabies. *Am. J. Vet. Res.* 1983; 44: 123-25.
62. Maes RK, Besiel CE, Spatz SJ, Thacker BJ. Polymerase chain reaction amplification of Pseudorabies virus DNA from acutely and latently infected cells. *Vet. Microbiol.* 1990; 24: 281-295.
63. *Manual Merck de Veterinaria*. 5ta Edición. Océano Grupo Editorial S.A. Barcelona España. 2000: 1081-2108.
64. *Manual Técnico de Crianza Porcina*. Instituto de Medicina Veterinaria (IMV). 2000.
65. Margni RA. *Inmunología e Inmunohistoquímica*. 3ra Ed. Edit. Científico Técnico. 1982: 45-397.
66. Martin S, Wardley RC, Donaldson AI. Serological response of pigs infected with Aujeszky's disease virus. *Res. Vet. Sci.* 1983; 35:227-33.
67. Medveczky I, Kovacs L. The role of the housefly, *Musca domestica* in the spread of Aujeszky's disease. *Res. Vet. Entomol.* 1988; 2: 81-86.

68. Mengeling WL, Brockmeier SL, Lager KM, Vorwald AC. The role of biotechnologically engineered vaccines and diagnostics in pseudorabies. *Res. Vet. Microbiol.* 1997; 55:46-90.
69. Mengeling WL, Pirtle EO. Sequential changes in the humoral immune response of pigs to pseudorabies virus after vaccination. *Res. Vet. Diagn. Invest.* 1990; 2: 35-43.
70. Mettenleiter TH. Immunobiology of pseudorabies. *Res. Vet. Immunol. Immunopathol.* 1996; 54:221-29.
71. Meyer EK. Vaccine associated adverse events. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.* 2001; 31 (3): 493-514.
72. Miry C, Pensaert MB. Sites of Virus replication in the genital organs of boars inoculated in the cavum vaginale with pseudorabies virus. *Am. J. Vet. Res.* 1989;50: 345-348.
73. Moenig V, Woldeembet P, Frey HR, Liess B, Dopolka HD, Behrens F. Comparative evaluation of ELISA and neutralization test for the diagnosis of Aujeszky's disease. *Curr. Top. Vet. Med. Anim. Sci.* 1982; 17: 51-6.
74. Mogollón JD, Rincón MA, Arbelaez G. Aplicación de la serología para el diagnóstico y control de las enfermedades porcinas en América Latina. *Rev. Diagnóstico Veterinario. Colombia.* 2003;1
75. Molitor T, Thawley D. Pseudorabies vaccines: past, present, and future. *Compendium on Continuin Education for the Practicing Veterinarian*, 1987; 20 (9): 409-416.
76. Moran LE, Martínez MC. Metodología para la investigación del Anteproyecto de Tesis de Maestría. Dpto. de Biología. CEBI. UO.2000
77. NC: 26-12-81. Tecnología de producción cubana de la vacuna inactivada Aujeszky
78. Neill JA, Kelling CL Rhodes, MB. Specificity of Pseudorabies virus serotests. *Am. J. Vet. Res.* 1984; 45: 2675-76.
79. Office International des Epizooties (OIE). Aujeszky's disease. Manual of Standards for diagnostic test and vaccines, 1996.
80. Office International des Epizooties (OIE). Aujeszky's disease. Manual of Standards for diagnostic test and vaccines, 2000.
81. Oirschot V, De Waal JH. An ELISA to distinguish between Aujeszky's disease vaccinated and infected pigs. *Res. Vet.* 1987; 121: 305-306.
82. Oirschot V. Properties of g1-negative vaccines and companion diagnostic test for the eradication of Aujeszky's disease. *Proc 96<sup>th</sup>. Annual meeting USAHA.* 1992:405-416.

83. Oirschot V. Vaccination and Control of Aujeszky's disease. Kluwer Academic Publishers. 1989: 191-206.
84. Oren SL, Swenson SL, Kinker DR, Hill HT, Zimmerman J Evaluation serological pseudorabies test for the detection of antibodies during early infection. Res. Vet. Med. 1993; 88: 672-678.
85. Pensaert MB, De Smet K, Waele K. Extent and duration of virulent virus excretion upon challenge of pigs vaccinated with different glycoprotein deleted Aujeszky's disease vaccines. Res. Vet. Microbiol, 1990; 22:107-17.
86. Pensaert MB, Kluge JP. Pseudorabies virus. Edit. Science Publishers 1989:39-65.
87. Platt KB. The porcine humoral response to a detergent extracted Aujeszky's disease virus antigens. Res. Vet. Microbiol. 1982; 7: 515-34.
88. PNO: Determinación de la concentración de hidróxido de Aluminio, código: 8-04-017.
89. PNO: Determinación de la concentración de timerosal, código: 8-04-013.
90. PNO: Determinación de las propiedades organolépticas de las vacunas inactivadas, código: 8-02-006. 3ra Ed.
91. PNO: Ensayo de esterilidad por el Método Directo, código: 8-03-003.
92. PNO: Inactividad de la vacuna Aujeszky, código: 7-02-070.
93. PNO: Preparación de cultivo primario de embriones de pollo, código: 7-08-034.
94. PNO: Preparación de solución de cristal violeta al 0,1%, código: 7-08-006.
95. PNO: Preparación de solución de Etanol al 80%, código: 7-08-010.
96. PNO: Preparación de solución de tripsina al 0,25%, código: 7-08-011.
97. PNO: Preparación de solución de yodo al 1%, código: 7-08-008.
98. PNO: Preparación de solución salina tamponada con fosfatos (PBS), código: 7-08-025.
99. PNO: Titulación de suspensiones biológicas por los métodos estadísticos de Reed-Muench y Spearman Kurber, código: 8-02-050.
100. PNO: Vacuna inactivada contra la enfermedad de Aujeszky (Inocuidad), código: 8-02-041. 2da.Ed.
101. PNO: Vacuna inactivada contra la enfermedad de Aujeszky (Potencia), código: 8-02-042. 2da.Ed.
102. PNO: Vacuna inactivada contra la enfermedad de Aujeszky. Control del producto terminado, código: 8-02-001.
103. PNO: Vacuna inactivada contra la enfermedad de Aujeszky. Estabilidad, código: 8-02-003.

104. Pujols J, Badiola I, Callena A, Perez R, Romero L. Medios diagnósticos de la Enfermedad de Aujeszky aplicados al objetivo de control y erradicación. *Anaporc*, 1995; 146: 5-15.
105. Rziha HG, Mettenleiter THC, Ohlinger V, Wittman G. Herpesvirus latency in swine. *Res. Virology*, 1986; 155: 600-613.
106. Sagar M, Goyao T, Laughlin L. Evaluation for two comercial ELISA TEST kits for the detection of Pseudorabies antibodies in pigs. *J Vet Diagn Invest*. 1990; 2: 350-2.
107. Sánchez VJM. Curso de Inmunología Porcina. *Fichero Porci*. 2003.
108. Sánchez VJM. Bioseguridad de las explotaciones porcinas. *Fichero Porci*. 1988; 2: 69-77.
109. Schlesinger K, Polson D. Títulos de anticuerpos seroneutralizantes después de la vacunación de la vacuna Ingelvac por vía intramuscular e intranasal. Datos de investigación en ficheros de Boehringer Ingelheim Nobl. Laboratories Inc. 1997
110. Schultz RD. The immune system and vaccines: Challenges for the 21<sup>st</sup> century. *Compendium on Continuin Education for the Practicing Veterinariam*, 1988; 20 (8): 25-30.
111. Shang JM; Osorio FA. A quantitative technique for the study of the latency of Aujeszky virus. *Res. Sci. Off. Int. Epiz*, 1993; 12: 505-521.
112. Sigaroa A. *Biometría y Diseño Experimental*. Tomo I y II. 1986.
113. Skalka B .*Virología Veterinaria*. UH. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Instituto Cubano del Libro. 1971
114. Sois A, Alemany R, Sabih N, España E, Artigas C. Desarrollo y adaptación de la técnica IPMA para el diagnóstico de la Enfermedad de Aujeszky. I Symposium de Avedila, Expoáviga'95, 1995; 777-778.
115. Stellman C, Vannier P, Chappuis G, Brun A, Dauvergne M, Fargeaud D, Bugaud M and Colson X. The potency testing of pseudorabies vaccines in pigs. A proposal for a quantitative criterion and a minimum requeriment. *J. Biol. Stand*. 1989; 17: 17-27.
116. *Tabloide Universidad para Todos*. Biotecnología. Editorial Juventud Rebelde. 2002
117. Taboada A, Fraga I. Efecto de la concentración de glicerina en un medicamento de origen natural. *Rev. Salud Animal*. 2002; 1(24):36-42.
118. Thawley DG, Wright JC. Solorzano RF. Epidemiologic monitoring following and episode of Pseudorabies involving swing, sheep and cattle. *JAVWA*. 1980; 176 (10): 1001-1003.
119. Trujillo N, Martínez N, Sánchez B, Torres A, León S, Nuñez I, Izquierdo F. Obtención y evaluación de una vacuna inactiva contra la enfermedad de Aujeszky. I Jornada Científica de la Empresa Cubana de Productos Veterinarios. 1987.

120. URL :<http://w.w.w. exopol.com/default.html>.(consultada, 11-1-2004).
121. URL :<http://w.w.w.ocpi.cu/doc>(consultada, 7-1-2005).
122. URL:<http://w.w.w.avancesentecnologiaporcina.com/contenidos/serolmay1.htm> (consultada, 6-5-2003).
123. URL:<http://w.w.w.bi-vetmedica.com.mx/images/x1a.PDM>.(consultada,4-10-2003).
124. URL:<http://w.w.w.es.merial.com>(consultada, 5-4-2003).
125. URL:<http://w.w.w.info.Aujeszky.com/4K> (consultada 4-2-2004).
126. URL:<http://w.w.w.medigraphic.com>.(consultada, 14-2-2005).
127. URL:<http://w.w.w.sanidadanimal.info/>(consultada, 5-4-2003).
128. Vademécum de Productos Biológicos Vacuna Aujeszky. Grupo Empresarial LABIOFAM. 2002.
129. Van Oirschot JT, Dei HL. Comparison of two ELISAs for detecting antibodies to glycoprotein I of Aujeszky's disease virus.. *Vet Res.* 1989; 125: 63-64.
130. Van Oirschot JT, Rziha HJ, Moonen PJLM, Pol JMA, Van Zaane D. Differentiation of serum antibodies from pigs vaccinated or infected with Aujeszky's Disease virus by a Competitive Enzyme Immunoassay. *J Gen Virol*, 1986; 67: 1179-1182.
131. Vandepute J y Braun HJ. Control y posibilidades de erradicación de la enfermedad de Aujeszky con vacunas vivas e inactivadas a partir de virus con o sin delección en el genoma. *Rev. ONE. Vet.* 1988; 1: 3-6.
132. Vannier P.Efficacite de deux vaccins contre la maladie d'Aujeszky.*Rec.Vet. Med.* 1984; 160 (1): 61-68.
133. Vannier P. Efficacy of attenuated live- and inactivated virus vaccines in pigs with or with passive immunity. *Res. Vet.* 1985;46: 1498-1502.
134. Vannier P. Vaccination et controle des herpesviroses le cas de la maladie d'Aujeszky chez le porc. *Point Vet.* 1996; 28: 261-7.
135. Visser N. Vaccination strategies for improving the efficacy of programs to eradicate Aujeszky's disease virus. *Res. Vet. Microbiol.* 1997; 55: 61-74.
136. Wheler JG, Osorio FA. Investigation of sites of pseudorabies virus latency using polimerase chain reaction. *Am . Journal. Vet.* 1989; 52: 1799-1803.
137. Wittman G and Rziha HG. Aujeszky's disease in pigs. . Kluwer Academic Publishers. 1989: 230-35.

138. Wittmann G, Rziha HG. Aujeszky's disease in pigs. Kluwer. Academic Publishers. 1999: 350-57.
139. Zuckermann FA.. Aujeszky's disease virus: opportunities and challenges. Vet Res, 2000; 31:121-131.

Tabla #1 Organización y Formación de los grupos de experimentación

<b>grupos</b>	<b>Vacunados / # de animales</b>	<b>Controles / # de animales</b>
<b>1</b>	<b>A/11</b>	<b>B/4</b>
<b>2</b>	<b>C/11</b>	<b>D/4</b>
<b>3</b>	<b>E/11</b>	<b>F/4</b>

Tabla #2. Resultados de los controles de calidad de la vacuna Aujeszky .Lote 0409002

<b>Análisis del lote</b>	<b>Parámetros (OIE, 2000)</b>	<b>Resultados</b>
<b>PH</b>	<b>7.2-7.3</b>	<b>7.3</b>
<b>Concertación de timerosal</b>	<b>≤ 0.1 mg / mL</b>	<b>0.02 mg / mL</b>
<b>Concentración de Al(OH)<sub>3</sub></b>	<b>5-10mg / mL</b>	<b>6.5 mg / mL</b>
<b>Esterilidad</b>	<b>Libre de microorganismos viables</b>	<b>Ausencia de microorganismos viables</b>
<b>Inactividad</b>	<b>No deben aparecer síntomas de la EA, ni prurito en el punto de inoculación.  La prueba se realizará en conejos</b>	<b>Satisfactorio</b>
<b>Porcentaje de glicerina</b>	<b>1-10%</b>	<b>3%</b>

Tabla 3. Comportamiento de la temperatura corporal promedio, post vacunación con una y dos dosis.

<b>Grupos experimentales</b>	<b>Temperatura promedio <sup>0</sup> C / días</b>					
	<b>Vacunación con una dosis</b>			<b>Vacunación con dos dosis</b>		
	<b>Día 2</b>	<b>Día 7</b>	<b>Día 14</b>	<b>Día 16</b>	<b>Día 21</b>	<b>Día 28</b>
<b>1</b>	37.5	37.2	37.2	37.2	37.5	37
<b>2</b>	37.2	37	37.6	37.6	37.5	37.2
<b>3</b>	37.2	37.6	37.6	36.6	37.5	37.2

**Tabla 4. Comportamiento del peso promedio entre el grupo control y los vacunados.**

Grupo experimental	Peso promedio (Kg.)									
	Controles					Vacunados				
	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
1	17.3	19.4	22.4	24.1	26	17.5	19.4	21.3	22.9	24.6
2	18.5	20.6	18.4	24.5	26	16.7	20.1	17.2	23.8	25.6
3	17.9	19.1	21	22.9	25	17.4	18.9	20.9	22.6	24.2

Tabla #5 Comportamiento del título de anticuerpos en los animales vacunados con una dosis en el grupo 1, según la técnica de SN.

	Títulos				Resultado Final
	1/2	1/4	1/8	1/16	
Testigos					
1	-				-1/2
2	-				-1/2
3	-				-1/2
4	-				-1/2
Vacunados					
5	+	+	+	-	+1/8
6	+	+	-	-	+1/4
7	+	+	-	-	+1/4
8	+	-	-	-	+1/2
9	+	+	-	-	+1/4
10	+	-	-	-	+1/2
11	+	-	-	-	+1/2
12	+	+	-	-	+1/4
13	+	+	-	-	+1/4
14	+	-	-	-	+1/2
15	+	-	-	-	+1/2

Tabla # 6. Resumen final del comportamiento del título de anticuerpos, según la Técnica de SN en animales vacunados con una dosis en el grupo 1.

Lectura	titulación		
	1/2	1/4	1/8
Negativos	-	-	-
Positivos	5	5	1

Tabla #7. Comportamiento del título de anticuerpos en los animales vacunados con una segunda dosis en el grupo 1, según la técnica de SN.

	Títulos				Resultado final
	1/2	1/4	1/8	1/16	
Testigos					
1	-				-1/2
2	-				-1/2
3	-				-1/2
4	-				-1/2
Vacunados					
5	+	+	-	-	+1/4
6	+	+	-	-	+1/4
7	+	+	+	-	+1/8
8	+	+	+	-	+1/8
9	+	+	-	-	+1/4
10	+	+	-	-	+1/4
11	+	+	+	-	+1/8
12	+	+	+	-	+1/8
13	+	+	-	-	+1/4
14	+	+	-	-	+1/4
15	+	+	-	-	+1/4

**Tabla # 8 Resumen final del comportamiento del título de anticuerpos, según la técnica de SN en animales vacunados con dos dosis en el grupo 1.**

Lectura	titulación		
	1/2	1/4	1/8
Negativos	-	-	-
Positivos	-	7	4

Tabla # 9 Comportamiento del título de anticuerpos en los animales vacunados con una dosis en el grupo 2, según la técnica de SN.

	Títulos				Resultado Final
	1/2	1/4	1/8	1/16	
Testigos					
1	-				-1/2
2	-				-1/2
3	-				-1/2
4	-				-1/2
Vacunados					
5	+	+	+	-	+1/8
6	+	+	-	-	+1/4
7	+	-	-	-	+1/2
8	+	+	+	-	+1/8
9	+	-	-	-	+1/2
10	+	+	-	-	+1/4
11	+	+	-	-	+1/4
12	+	-	-	-	+1/2
13	+	+	-	-	+1/4
14	+	-	-	-	+1/2
15	+	-	-	-	+1/2

**Tabla # 10. Resumen final del comportamiento del título de anticuerpos, según la Técnica de SN en animales vacunados con una dosis en el grupo 2.**

Lectura	titulación		
	1/2	1/4	1/8
Negativos	-	-	-
Positivos	5	4	2

Tabla # 11. Comportamiento del título de anticuerpos en los animales vacunados con una segunda dosis en el grupo 2, según la técnica de SN.

	Títulos				Resultado final
	1/2	1/4	1/8	1/16	
Testigos					
1	-				-1/2
2	-				-1/2
3	-				-1/2
4	-				-1/2
Vacunados					
5	+	+	-	-	+1/4
6	+	+	+	-	+1/8
7	+	+	-	-	+1/4
8	+	+	-	-	+1/4
9	+	+	+	-	+1/8
10	+	+	-	-	+1/4
11	+	+	+	-	+1/8
12	+	+	-	-	+1/4
13	+	+	+	-	+1/8
14	+	+	+	-	+1/8
15	+	+	-	-	+1/4

Tabla # 12 Resumen final del comportamiento del título de anticuerpos, según la técnica de SN en animales vacunados con dos dosis en el grupo 2.

Lectura	titulación		
	1/2	1/4	1/8
Negativos	-	-	-
Positivos	-	6	5

Tabla #13 Comportamiento del título de anticuerpos en los animales vacunados con una dosis en el grupo 3, según la técnica de SN.

	Títulos				Resultado Final
	1/2	1/4	1/8	1/16	
Testigos					
1	-				-1/2
2	-				-1/2
3	-				-1/2
4	-				-1/2
Vacunados					
5	+	-	-	-	+1/2
6	+	-	-	-	+1/2
7	+	+	+	-	+1/8
8	+	-	-	-	+1/2
9	+	+	-	-	+1/4
10	+	-	-	-	+1/2
11	+	+	-	-	+1/4
12	+	+	-	-	+1/4
13	+	-	-	-	+1/2
14	+	-	-	-	+1/2
15	+	-	-	-	+1/2

Tabla #14. Resumen final del comportamiento del título de anticuerpos, según la técnica de SN en animales vacunados con una dosis en el grupo 3

Lectura	Titulación		
	1/2	1/4	1/8
Negativos	-	-	-
Positivos	7	3	1

Tabla #15. Comportamiento del título de anticuerpos en los animales vacunados con dos dosis en el grupo 3, según la técnica de SN.

	Títulos				Resultado final
	1/2	1/4	1/8	1/16	
Testigos					
1	-				-1/2
2	-				-1/2
3	-				-1/2
4	-				-1/2
Vacunados					
5	+	+	+	-	+1/8
6	+	+	-	-	+1/4
7	+	+	-	-	+1/4
8	+	+	+	-	+1/8
9	+	+	-	-	+1/4
10	+	+	-	-	+1/4
11	+	+	-	-	+1/4
12	+	+	+	-	+1/8
13	+	+	-	-	+1/4
14	+	+	-	-	+1/4
15	+	+	-	-	+1/4

Tabla #16. Resumen final del comportamiento del título de anticuerpos, según la técnica de SN en animales vacunados con dos dosis en el grupo 3.

Lectura	titulación		
	1/2	1/4	1/8
Negativos	-	-	-
Positivos	-	8	3

**Leyenda:**

- (-) Negativo
- (+) Positivo

## **Valoración económica:**

### Datos elementales:

Costo de 1 lechón: \$ 34.65

Costo de 1 carnero: \$ 224.45

Número de lechones utilizados en la prueba de potencia: 15

Número de carneros utilizados en la prueba de potencia: 7

Número de lotes anuales: 10

Días de la prueba de potencia en lechones: 28

Días de la prueba de potencia en carneros: 14

Consumo total de pienso en carnero 0.3 Kg / d

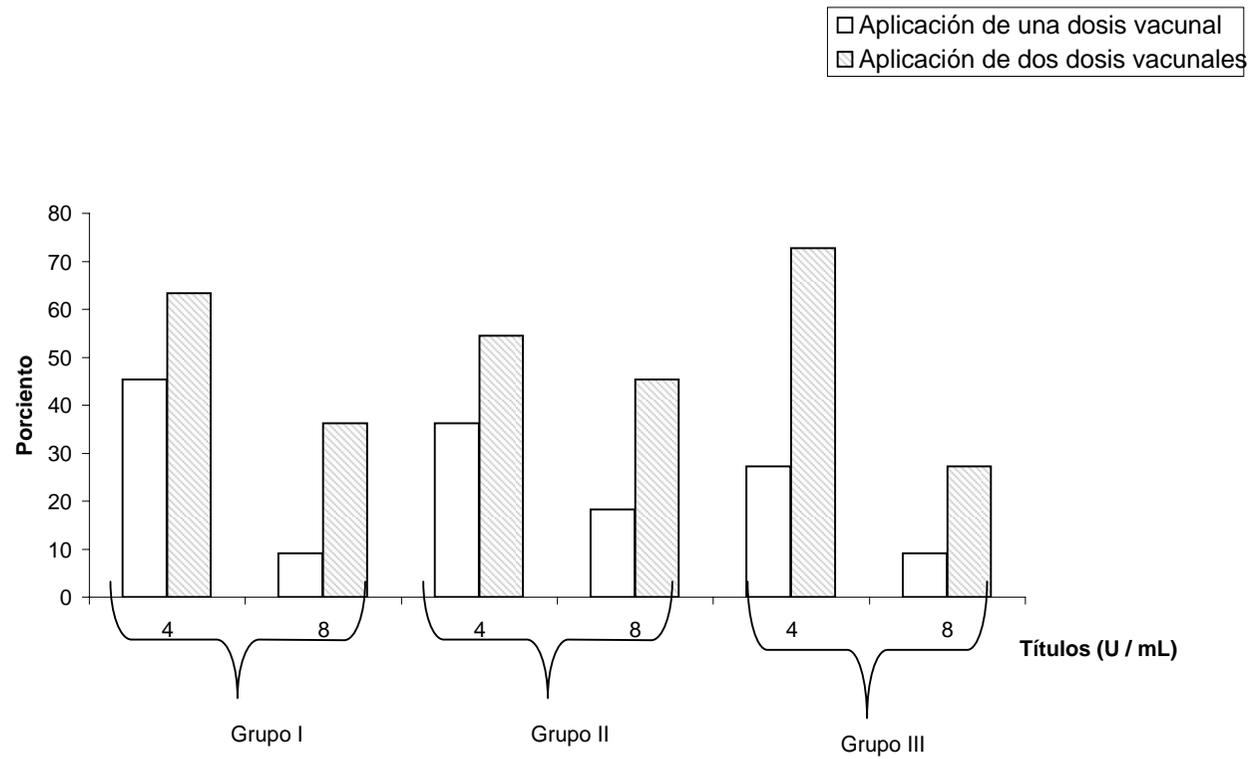
Consumo total de pienso en lechones 0.4 Kg /d

Costo del pienso: \$ 0.60 (1 Kg.)

En LABIOFAM se elabora un promedio de 10 lotes de Vacuna Aujeszky Inactivada anuales, utilizando en las pruebas de inocuidad y potencia 7 carneros por lote, según la NC-26-12-81, para un costo total incluyendo alimentación de \$ 1600.55, representando un total en el año de \$ 16 005.50 MN. A estos animales se les debe aplicar eutanasia al final de la prueba.

Utilizando cerdos susceptibles para realizar estos controles, según lo establece la OIE, el costo sería de \$ 6880.00 MN anualmente, y posteriormente estos animales pueden ser llevados a cebaderos para su engorde y consumo final.

Considerando que con las pruebas de potencia según el Manual Estándar de la OIE, se ahorra \$ 9125.50 MN anualmente.



**Gráfico 3. Porcentaje de lechones con título de seroconversión mayor de 1:2, en los tres grupos experimentales**