

# Identificación del antígeno del virus de la fiebre porcina clásica en excretas porcinas sólidas y líquidas en una granja del estado de Guanajuato, México

## Identification of Classical Swine Fever virus antigen in solid and liquid swine faeces from a Guanajuato State farm, Mexico

Juan Francisco Quezada Monroy<sup>a</sup>, María del Carmen Mercado García<sup>a</sup>, Gerardo Ramírez Hernández<sup>a</sup>, Roberto Martínez-Gamba<sup>a</sup>, Martha Macías G<sup>b</sup>

### RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo detectar la presencia del virus de fiebre porcina clásica (vFPC) a partir de residuos orgánicos. Se evaluaron un total de 40 muestras del material de cárcamo de recolección, excretas sólidas y líquidas separadas, de ocho granjas ubicadas en la región central de México, las cuales tienen implementado un sistema de tratamiento de excretas por medio de un separador de sólidos y líquidos. Todas las muestras se procesaron por medio de las pruebas de inmunofluorescencia directa, inmunoperoxidasa directa y ELISA de captura para evidenciar la presencia del vFPC. Todas las muestras resultaron negativas por las pruebas de inmunoperoxidasa e inmunofluorescencia. En relación a la prueba de ELISA de captura, dos de las muestras resultaron positivas (5.0 %), las cuales provenían de la misma granja ubicada en el estado de Guanajuato, una del cárcamo de sedimentación y la otra del material sólido. El vFPC puede ser aislado a partir excretas porcinas sólidas y de muestras del cárcamo. La prueba de ELISA de captura resultó ser más sensible debido a su capacidad para detectar proteínas específicas del vFPC. Las pruebas de inmunoperoxidasa directa e inmunofluorescencia directa no detectaron al virus.

**PALABRAS CLAVE:** Virus, Fiebre porcina clásica, Excretas porcinas.

### ABSTRACT

The purpose of this study was the detection of Classical Swine Fever virus (CSFv) in organic waste matter. A total of 40 samples from collection basin sludge, solid faeces and separated liquid phases from eight farms with faeces treatment systems based on a liquid and solids separation process in Central Mexico, were evaluated. All the samples were tested by direct immunofluorescence, direct immunoperoxidase and capture ELISA techniques to determine the presence of CSFv. The results from all samples were negative to immunoperoxidase and immunofluorescence tests. Two of the samples showed positive results to a capture ELISA test (5.0 %). Both samples were collected in the same farm in the State of Guanajuato, one from the sedimentation basin and the other from separated solid matter. The CSFv may be isolated from solid swine excrement and from solid waste matter in the basin as well. The capture ELISA test proved to be more sensitive, due to its ability to detect specific CSFv proteins. Immunoperoxidase and immunofluorescence tests failed to detect the virus.

**KEY WORDS:** Virus, Classic Swine Fever, Pig faeces.

### INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la mayor parte de las granjas porcinas tecnificadas emplean sistemas de limpieza

### INTRODUCTION

Nowadays, most of the modern swine farms employ cleaning systems based on a hydraulic waste dragging

Recibido el 26 de abril de 2005 y aceptado para su publicación el 9 de agosto de 2005.

<sup>a</sup> Departamento de Producción Animal: Cerdos. Circuito Exterior de Ciudad Universitaria. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 04510 robertom@servidor.unam.mx. Correspondencia al 4° autor.

<sup>b</sup> Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria.

Este trabajo fue apoyado por el proyecto PAPIIT-UNAM número IN210997.

basados en el arrastre hidráulico de las excretas. El manejo de las excretas porcinas en forma líquida ha estimulado la implementación de sistemas de tratamiento basados en la separación mecánica de los sólidos y en la sedimentación<sup>(1)</sup>. De estos se obtienen: líquidos, que son almacenados por largos periodos en lagunas o tanques de almacenamiento en condiciones anaerobias, lodos que son usados como fertilizantes en tierras cercanas a las granjas, y sólidos separados que son vendidos como fertilizantes y que en algunos casos se incorporan a la alimentación animal en la misma granja o en otras explotaciones pecuarias localizadas a grandes distancias.

Antiguamente el almacenamiento de las excretas en los estercoleros permitía el desarrollo de procesos microbianos termofílicos, con los cuales se lograba la destrucción de los gérmenes patógenos. Sin embargo, hoy en día el manejo de las excretas en forma líquida ha alterado la composición de las mismas, dando como resultado que el estiércol líquido no genere un proceso de fermentación lo suficientemente efectivo como para destruir a los agentes infecciosos, y probablemente algunas de las enfermedades que estos originan son diseminadas por este tipo de material<sup>(2)</sup>.

Los procesos de almacenamiento y digestión anaeróbica de líquidos y lodos ofrecen condiciones donde, especialmente, los virus son eliminados muy lenta e inconsistentemente<sup>(3)</sup>, debido a que estos están estrechamente asociados con el material orgánico presente lo que hace más difícil su inactivación<sup>(4)</sup>.

Está comprobado que algunos agentes virales permanecen viables en excretas de cerdo por lapsos variables, tal es el caso del virus de la fiebre porcina africana que sobrevive 60 a 100 días, el de la enfermedad de Aujeszky de 3 a 15 semanas, el de la fiebre aftosa de 21 a 103 días y el parvovirus porcino por 14 semanas<sup>(5,6,7)</sup>. Otros virus que pueden permanecer viables en el estiércol son: el del circovirus porcino, el de la diarrea epidémica porcina y el que causa la fiebre porcina clásica (FPC)<sup>(8,9,10)</sup>.

En el caso del virus de la fiebre porcina clásica (vFPC), éste sobrevive en el estiércol por un tiempo

process. Management of swine faeces in a liquid form has promoted the use of waste treatment systems based in the mechanical separation of solids and a sedimentation process as well<sup>(1)</sup>. These systems produce liquids that are collected in ponds or basins, where they remain for a long time under anaerobic conditions; sediment mud used as a fertilizer for fields near to the farm; and separated solids sold as fertilizer that, in some instances, are also incorporated in the feed for the animals in the same farm or in animal production facilities located in a different region.

Previously, storing solid waste in dung collectors allowed the development of thermophilic microbial activity that promoted the destruction of pathogen agents. Nowadays, however, the management of manure in liquid form has caused the modification of its own composition, causing liquid manure to be incapable of promoting a fermentation process effective enough to destroy the infectious agents, and it seems likely that the diseases caused by those agents are in fact transmitted by this type of waste material<sup>(2)</sup>.

The use of anaerobic storage and digestion processes in the management of liquids and mud, provides conditions that cause many agents, particularly viruses, to be eliminated at a very slow and inconsistent pace<sup>(3)</sup> due to their close association with the organic matter, which makes it even more difficult to inactivate them<sup>(4)</sup>.

It has been demonstrated that some viral agents remain viable in swine faeces for a variable amount of time; such is the case of the African Swine Fever virus, which is capable of surviving for 60 to 100 d; the Aujeszky's Disease virus, which survives from three to 15 wk; the Foot-and-Mouth-Disease virus, which survives from 21 to 103 d; and the Porcine Parvovirus, which survives for up to 14 wk<sup>(5,6,7)</sup>. Some other viruses that are able to remain viable in manure are: Porcine Circovirus, Porcine Epidemic Diarrhea virus, and the Classical Swine Fever (CSF) virus<sup>(8,9,10)</sup>.

In the case of the Classical Swine Fever virus (CSFv), it survives in manure for a long time and

prolongado, y algunos estudios sugieren que la inactivación ocurre de forma más rápida en la fase líquida que en la fase sólida. En la fase líquida sobrevive por un mínimo de 70 días a 17 °C y por 84 días a 4 °C<sup>(10)</sup>. La supervivencia de este virus en el medio ambiente es afectada por muchas variables físicas o químicas como son la temperatura, humedad, pH, presencia de materia orgánica y la luz ultravioleta<sup>(11,12)</sup>. Además, el virus unido al sólido puede ser protegido contra la inactivación por un lapso de 15 días<sup>(13)</sup>.

Lo anterior establece la posibilidad de supervivencia del vFPC en sistemas de almacenamiento de excretas. En el caso de la presentación de un brote de una enfermedad de notificación obligatoria, como lo es la FPC en México, no sólo es importante implementar medidas de control para los animales, sino que también es necesario tomar acciones para evitar que los líquidos, los lodos y los sólidos producidos a partir de esa granja puedan servir como una fuente de infección que propague la enfermedad a otras granjas e incluso a otras regiones. Lo anterior, establece la importancia de contar con una metodología que permita la identificación del vFPC tanto en los líquidos como en los sólidos que se obtienen en las granjas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se realizó en dos fases: La fase 1 consistió en eliminar el efecto tóxico que ocasionan las heces sobre el cultivo celular y evidenciar la presencia del vFPC a partir de excretas de cerdo inoculadas de manera experimental. En la fase 2 se trabajó con muestras de cárcamo de recolección, líquidos separados y excretas sólidas obtenidas a partir de granjas porcinas comerciales.

### *Fase 1*

#### *Eliminación del efecto tóxico de las muestras de heces para inocular los cultivos celulares*

Las muestras de excretas contienen una gran cantidad de bacterias, toxinas y materia orgánica que puede dañar a las células utilizadas en el aislamiento de algún agente viral. Para eliminar

some studies suggest that the inactivation of the virus occurs more rapidly in the liquid phase than in the solid phase. The virus survives for a minimum of 70 d in the liquid phase at 17 °C and for 84 d at 4 °C<sup>(10)</sup>. Survival of this virus in the environment is determined by many physical and chemical variables, such as temperature, humidity, pH, presence of organic matter and ultraviolet light irradiation index<sup>(11,12)</sup>. In addition, a virus bound in solid matter may be protected against inactivation for 15 d<sup>(13)</sup>.

All of the above suggests that it is possible for CSFv to survive in manure collection and storage systems. In places where reporting the outbreak of any disease is mandatory; such as the case of CSF in Mexico, it is also important to implement control measures for animal management, as well as adequate measures to prevent any liquid, sludge and solid organic material produced in the farm from serving as a source of infection that facilitates the transmission of the disease to another farms, or to another regions. All this serves to highlight the importance of having a well-designed methodology for the detection and identification of CSFv in both liquid and solid waste materials produced in the farm.

## MATERIALS AND METHODS

The study was performed in two stages: Stage one comprised the elimination of the toxic effects of faeces in cell cultures and the detection of CSFv in experimentally inoculated swine faeces. Stage two comprised the study of samples from collection basins, separated liquids and solid faeces obtained in commercial swine farms.

### *Stage one*

#### *Elimination of toxic effects caused by faeces samples to inoculate cell cultures*

Faeces samples contain a high number of bacteria, toxins and organic matter that may damage the cells used to isolate a viral agent. In order to eliminate this toxic effect, the following method was employed: A suspension of 10 g of pig faeces

este efecto tóxico se realizó la siguiente metodología: se preparó una suspensión de 10 g de heces de cerdo en 10 ml de una solución amortiguadora de fosfatos (PBS); de esta suspensión se tomó una muestra de 2 ml y se le adicionó medio mínimo esencial (MME) (minimum essential médium, Sigma Aldrich Alemania Cat. M-0643) sin suero fetal bovino (SFB) (TerraCell International, Canada Cat.CS-C08-500-U) a razón de volumen por volumen, se centrifugó (Beckman, Model TJ-6, centrifuge, USA) a 1,315 xg durante 25 min. El sobrenadante resultante se filtró por una membrana de 0.22  $\mu$ m (Membranas Sartorius Alemania Cat. 11107-25-N). Se depositaron 100  $\mu$ l de la muestra por cuadruplicado en monoestratos de 24 h de la línea de células de riñón de cerdo (PK-15), dejando incubar las muestras por una hora a 37 °C. Posteriormente se decantaron las muestras y se adicionó MME sin SFB, dejando incubar durante 48 h.

#### *Identificación del vFPC en heces inoculadas experimentalmente*

Para determinar si el vFPC se podía recuperar a partir de excretas porcinas, se adecuó la metodología de Turner *et al.*<sup>(14)</sup>, quienes lograron aislar el virus. El primer paso consistió en titular un vFPC (cepa de referencia ALD), para esto se ocupó una microplaca para cultivo celular de 96 pozos fondo plano estéril (placas para cultivo celular Nunclon Dinamarca Cat.1633), la cual contenía un monoestrato de la línea de células PK-15 de 24 h de incubación. El MME utilizado contenía antibiótico (gentamicina, Sigma G1397). Se realizaron diluciones décuples desde 10<sup>1</sup> hasta 10<sup>8</sup>, para cada dilución se ocupó una columna de pocitos de la placa para cultivo celulares, depositando 50  $\mu$ l de cada dilución por pozo; en el caso del control de células se ocuparon dos columnas al igual que para el virus sin diluir, las células se dejaron incubar 48 h a 37 °C en una estufa de cultivo con 5 % de CO<sub>2</sub>. La presencia del virus se detectó por medio de la prueba de inmunoperoxidasa indirecta. El título que se obtuvo fue de 10<sup>4</sup>.

Posteriormente se colectó una muestra de 100 g de heces directamente del recto de un cerdo de 60 kg

in 10 ml of phosphate buffer solution (PBS) was prepared. A two ml sample of the suspension was taken and added minimum essential medium (MEM, Sigma Aldrich Germany Cat. M-0643) without bovine fetal serum (BFS) (TerraCell International, Canada Cat.CS-C08-500-U), at a volume per volume ratio. The sample was then centrifuged (Beckman, Model TJ-6, centrifuge, USA) at 1315 xg during 25 min. The supernatant obtained was filtered through a 0.22  $\mu$ m sterile membrane (Sartorius Membranes, Germany Cat. 11107-25-N). A 100  $\mu$ l sample was added, by quadruplicate, to 24 h old pig kidney cell monolayer (PK-15) and incubated at 37 °C during one hour. Afterwards, the samples were decanted and added MEM without BFS, and were incubated during 48 h.

#### *Identification of CSFv in experimentally inoculated faeces*

In order to establish the possibility of isolating CSFv from swine faeces, we followed the methodology suggested by Turner *et al.*<sup>(14)</sup>: who were able to isolate the virus.

The first step was the titration of CSFv by means of a sterile, 96 well cell culture microplate with flat bottom (Cell Culture Microplates, Nunclon Denmark Cat. 1633) containing a PK-15 cell monostrata, incubated during 24 h. Decuple dilutions from 10<sup>1</sup> to 10<sup>8</sup> were performed. One column of the cell culture microplate was used for each dilution, adding 50  $\mu$ l of each dilution per well. Two columns were used for control cell samples and for undiluted virus samples as well, leaving the cells in incubation at 37 °C, during 48 h into a cellular oven with 5% of CO<sub>2</sub>. The presence of the virus was detected by means of an indirect immunoperoxidase test, obtaining a 10<sup>4</sup> titre.

Afterwards, a 100 g faeces sample was collected from a 60 kg pig determined as serologically negative to the presence of anti-CSFv antibodies using the ELISA test.

Once determined the virus titre, a 500  $\mu$ l virus sample was added to 500  $\mu$ l of the 10 g faeces suspension previously described, mixed in 10 ml of PBS. The mix was homogenized and centrifuged at

el cual era negativo serológicamente por medio de la prueba de ELISA a la presencia de anticuerpo contra el vFPC. Una vez conocido el título del virus se procedió a colocar 500 µl del virus en 500 µl de una suspensión de 10 g de heces de la muestra citada anteriormente en 10 ml de PBS. Se homogeneizó y se centrifugó a 1,315 xg por 25 min en refrigeración (Beckman, Model TJ-R Refrigeration Centrifuge, USA). El sobrenadante se filtró a través de membranas de 0.22 µm de manera estéril. Se realizaron diluciones décuples del sobrenadante desde 10<sup>0</sup> hasta 10<sup>6</sup>, y se depositaron 100 µl por cuadruplicado en monoestratos de la línea de células PK-15 de 24 h de crecimiento. Se dejó incubar 1 h a 37 °C, se decantó el sobrenadante y se agregó MME sin SFB dejando incubar 48 h a 37 °C. La detección del virus se hizo por medio de la prueba de inmunoperoxidasa indirecta.

## *Fase 2*

### *Granjas evaluadas*

Se utilizaron muestras de excretas sólidas y líquidas de ocho granjas localizadas en cuatro Estados de la región central de México; se escogió esta zona debido a que en el momento del muestreo (febrero-abril del 2001), se encontraban en fase de erradicación con vacunación los estados de Guanajuato y Querétaro (región centro occidente) y de control los de México y Morelos (región centro sur) dentro de la campaña nacional para la erradicación de la FPC; en ese momento existían reportes de casos en la zona y se permitía la vacunación con las vacunas atenuadas señaladas en la Norma de la Campaña Nacional contra la Fiebre Porcina Clásica (NOM-037-ZOO-1995). Se seleccionaron granjas que tuvieran un sistema de tratamiento de excretas con un cárcamo de sedimentación, donde son depositadas todas las excretas provenientes de las diferentes áreas de la granja, un tiempo de retención de una semana como mínimo, y un separador de sólidos y líquidos. De cada granja, se tomaron dos muestras del cárcamo, dos muestras de la fase sólida y dos muestras de la líquida.

### *Muestreo*

De cada granja se colectaron 200 ml de material del cárcamo de sedimentación a partir de cinco

1315 xg during 25 min in refrigeration (Beckman, Model TJ-R Refrigeration Centrifuge, USA). The supernatant was filtered through a 0.22 µm membrane under sterile conditions. Decuple dilutions of the supernatant were performed from 10<sup>0</sup> to 10<sup>6</sup>, and a 100 µl sample was deposited, by quadruplicate, in 24 h PK-15 cell monolayer. The samples were incubated at 37 °C during one hour. Afterwards, the samples were decanted and added MEM without BFS, and were incubated at 37 °C during 48 h. Indirect immunoperoxidase testing was used to detect the presence of the virus.

### *Stage two*

#### *Evaluated farms*

Liquid and solid faeces samples from eight different farms in four states in Central Mexico were used. This region was chosen because at the time of obtaining the samples (January to March, 2001), there were in eradication with vaccination phase the states of Guanajuato and Queretaro (central-west region) and in control the states of Mexico and Morelos (central-south region) as part of the national campaign for the eradication of CSF. In addition, there were reported disease cases in the region at that time and the immunization with attenuated vaccines was allowed as point out the national campaign for the eradication of CSF (NOM-037-ZOO-1995). Farms with a manure treatment system including a sedimentation basin (were all the faecal waste from all the areas of the farm is collected and remains for a week as a minimum), and a liquid and solids separation mechanism, were selected for the study. From each farm were taken two samples from sedimentation basin, solid fraction and liquids.

#### *Sampling*

A 200 ml sample of matter from five different points in the sedimentation basin was collected to complete a one liter sample for each farm in the study. Samples were stored in sterile glass containers (Crisol, Mexico Cat. Inmeg-ban 1172). The samples were identified and transported inside a polyurethane box (Polimex Mexico Cat. Caj-015) with refrigerants.

puntos diferentes, hasta completar un litro de muestra. Las muestras se depositaron en recipientes de vidrio estériles (El Crisol, México Cat. Inmegban 1172), se identificaron y se transportaron en una caja de poliuretano (Polimex México Cat. Caj-015) con refrigerantes.

Del aparato de separación de sólidos y líquidos se tomaron muestras de 100 ml a intervalos de 5 min hasta completar un litro, la muestra se tomó directamente de la manguera que conduce el efluente a la laguna de fermentación. De cada litro obtenido del cárcamo de sedimentación y líquidos provenientes del aparato de separación se homogenizó y se tomaron 2.5 ml que se colocaron en tres criotubos de 4 ml (Nunc Brand Dinamarca Cat. 1633). Para cada granja y tipo de muestra se realizaron dos repeticiones de acuerdo con el método descrito por Monteith y Shannon<sup>(15)</sup>.

Para el caso de los sólidos separados, se colectaron muestras de 500 g a partir de cinco lugares diferentes del depósito; de éstas se realizó una mezcla de la cual se obtuvieron 500 g, la cual se consideró la muestra de cada granja, se transportó en bolsas de plástico y en refrigeración. De cada muestra de sólidos separados se tomaron 5 g, que se colocaron en criotubos de 4 ml con medio de cultivo celular sin suero.

Todos los viales se mantuvieron en nitrógeno líquido hasta el momento de procesar las muestras por las pruebas de inmunofluorescencia directa, inmunoperoxidasa directa y ELISA de captura.

#### *Recuperación del virus*

Las muestras de heces se homogenizaron a una relación volumen por volumen con MME sin SFB. Previamente se prepararon botellas de plástico (Botellas de plástico Nunclon Dinamarca Cat. 163371) para cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup> de superficie de crecimiento con monocapas de la línea celular PK-15. Las botellas se infectaron con las muestras homogenizadas y se dejaron incubar 60 min en la estufa para cultivo celular, posteriormente se congelaron. Veinticuatro horas después se descongelaron y el contenido se decantó en tubos vacutainer (MonoJect, sin aditivo estéril Cat. 8881-

Small samples were collected from the liquid and solids separator every five min to complete a one liter sample. The samples were taken directly from the hose conducting the effluent to a fermentation lagoon. Out of each one liter sample from the sedimentation basin and the liquid in the separation system, a 2.5 ml volume was taken and stored in 4 ml cryotubes (Nunclon Brand Denmark Cat. 1633). Two repetitions for each farm and sample type were carried out following the method described by Monteith and Shannon<sup>(15)</sup>.

In the case of separated solids, 500 g samples from five different points in the tank were collected. These samples were mixed together to obtain a new 500 g sample, considered a representative sample of the farm, which was stored in plastic bags and under refrigeration conditions. A 5 g sample from each separated solids sample was obtained and placed in four ml cryotubes with culture medium without serum.

All the vials were preserved in liquid nitrogen until the time of being processed with direct immunofluorescence, direct immunoperoxidase and capture ELISA tests.

#### *Isolation of the virus*

Faeces samples were homogenized with MEM without BFS, in a volume by volume ratio. Previously, the 25 cm<sup>2</sup> cell culture plastic bottles (Plastic Bottles Nunclon Denmark Cat. 163371) were prepared with swine kidney cells (PK-15). The bottles were infected with the homogenized samples, were incubated during 60 min in a cell culture oven, and were later frozen. The samples were thawed 24 h later and their contents were decanted into vacutainer tubes (MonoJect, sterile without additives Cat. 8881-301512) which were then centrifuged at 1315 xg during 25 min in refrigeration (Beckman, Made in USA, Model TJ-R Refrigeration Centrifuge), afterwards, the samples were filtered with a 0.22 µm membrane under sterile conditions.

#### *Cell culture*

A 96 well culture plate was prepared with PK-15 cells and incubated during 24 h. After incubation,

301512) los cuales se centrifugaron a 1315 xg por 25 min en refrigeración (Beckman, Made in USA, Model TJ-R Refrigeration Centrifuge), posteriormente las muestras fueron filtradas de manera estéril a través de membranas de 0.22 µm.

#### *Cultivo celular*

Se preparó una placa para cultivo celular de 96 pozos con la línea de células PK15, la cual se dejó incubar por 24 h; posteriormente se decantó el MME con SFB y se depositaron 50 µl de cada una de las muestras por cuadruplicado, las muestras fueron incubadas por 60 min en la estufa para cultivo celular a 37 °C. Una vez terminado el tiempo de incubación se decantó la placa y se adicionaron 200 µl de MME sin SFB dejando incubar 48 h a 37 °C.

Al término de este tiempo, se recolectó el sobrenadante de cada una de las muestras y se colocaron en tubos vacutainer estériles. Los sobrenadantes se mantuvieron en congelación hasta el momento de realizar la prueba de ELISA de captura. Paso seguido, la placa se fijó con acetona al 30 % por 10 min; se decantó la acetona y se secó la placa al aire, posteriormente se dejó por 3 h en la estufa de cultivo celular para que se seque completamente. Las placas preparadas de este modo se utilizaron en las pruebas de inmunofluorescencia directa e inmunoperoxidasa directa, y las placas que no se trabajaron el mismo día, se mantuvieron en congelación.

#### *Inmunofluorescencia directa*

La placa previamente fijada con acetona al 30 % se lavó con 100 µl de una solución buferada de fosfatos (PBS) con Tween 80 (Sigma Aldrich USA Cat. P-1754) al 0.05 % por 5 min. Se decantó y secó para eliminar el exceso de solución de lavado (SL). A continuación se agregaron 25 µl del conjugado de isocianato de fluoresceína contra Pestivirus (Biotechnology Industrial Cat. 7610035) a una dilución 1:5 en cada pozo; se adicionaron 25 µl de PBS y se dejó incubar 30 min a 37 °C. El conjugado se diluyó en PBS. Al terminar la incubación se le volvieron a dar tres lavados de 150 µl y al final se secó. Finalmente se observó la placa en el microscopio de fluorescencia (Olympus IX70, objetivo 40x).

the MEM with BFS (TerraCell International, Canada, Cat. CS-C08-500-U) was decanted and 50 µl of each sample were taken, by quadruplicate. Later, the samples were incubated in an incubation oven at 37 °C during 60 min. After incubation, the plate was decanted and 200 µl of culture medium without BFS were added and the plate was incubated again at 37 °C during 48 h. After this step, the supernatant of each sample was collected and stored in sterile vacutainer tubes. The supernatants were frozen until the time of performing the capture ELISA test. Then, the plate was fixated in a 30 % acetone solution for 10 min. The acetone was decanted and the plate was air-dried and placed for three h in an incubation oven to dry it thoroughly. The plates prepared following this method were used in the direct immunofluorescence and direct immunoperoxidase tests. The plates that were not processed in the same day were maintained frozen.

#### *Direct immunofluorescence*

Once fixated in a 30 % acetone solution, the plate was rinsed with 100 µl of phosphates buffer (PBS) and 0.05 % Tween 80 solution (Sigma Aldrich USA Cat. P-1754) during 5 min. The plate was decanted to eliminate the excess rinse solution (RS). Then, 25 µl of fluorescein isocyanate against Pestivirus (Biotechnological Industrial Cat. 7610035) were added to a 1:5 dilution per well, along with 25 µl of PBS and it was incubated at 37 °C during 30 min. This conjugate was then diluted with PBS. After the incubation period, the plate was rinsed three more times with 150 µl of rinse solution and was dried. Later, the plate was observed under a fluorescence microscope (Olympus IX70, objective 40x).

#### *Direct immunoperoxidase*

Once fixated in a 30 % acetone solution, the plate was rinsed with 100 µl of a RS with PBS and 0.05 % Tween 80 during 5 min. Then, the plate was decanted and dried to eliminate the excess RS. After this, each well received 25 µl of polyclonal antiserum (Ceditest Biotechnological Industrial Cat. 7610030) against the conjugate of CSFv and peroxidase diluted in a dilution solution (DS) containing PBS, 0.01 % Tween 80 and 5 % equine

### *Inmunoperoxidasa directa*

A la placa previamente fijada con acetona al 30 %, se le realizó un lavado con 100  $\mu$ l de una SL que contenía PBS y Tween 80 al 0.05 % por 5 min; pasado este tiempo se decantó y se secó la placa para eliminar el exceso de SL. Enseguida se agregaron 25  $\mu$ l por pozo de un antisuero policlonal (Ceditest Biotechnological Industrial Cat.7610030) contra el vFPC conjugado con peroxidasa diluido en una solución de dilución (SD) que contenía: PBS, Tween 80 al 0.01 % y suero de caballo al 5 %, el conjugado se manejó a una dilución de 1:6 y se dejó incubar 60 min a 37 °C. Al terminar la incubación se lavó tres veces con 100  $\mu$ l por pozo con la SL, se decantó y secó, se adicionaron 50  $\mu$ l de sustrato e indicador (Ceditest Biotechnological Industrial Cat.7610030) y se dejó a temperatura ambiente por 15 a 20 min.

### *ELISA de captura*

Las muestras que correspondían al cárcamo 1 de la Granja 1 se mezclaron, tomando 150  $\mu$ l que requería la prueba, y se manejaron como una sola muestra (lo mismo se realizó para el resto de las granjas). Los sobrenadantes se analizaron mediante el kit comercial CHEKIT-CSF-Virus-II (Laboratorio Bommeli Suiza), el cual utiliza anticuerpos monoclonales específicos para detectar la glicoproteína EO (gp44/48), para lo cual se siguió el procedimiento descrito por el fabricante. Esta prueba maneja ciertos valores en porcentaje para determinar si una muestra es positiva, negativa o sospechosa. Si el valor es menor a 30 % se considera negativa, si se encuentra entre 30 y 40 % sospechosa y por arriba del 40 % es positiva.

Para cada prueba se determinó el porcentaje de muestras positivas tanto para los sólidos, los líquidos, y material del cárcamo de recolección. Para esto se utilizó una estadística de tipo descriptiva.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Con la metodología descrita se logró eliminar el efecto tóxico de las heces sobre los monoestratos de cultivo celular, ya que las células no mostraron

serum. The conjugate was prepared using a 1:6 dilution ratio and was incubated at 37 °C during 60 min. After incubation, each well was rinsed three times with 100  $\mu$ l of RS, and was decanted and dried. Afterwards, 50  $\mu$ l of indicator and substrate (Ceditest Biotechnological Industrial Cat. 7610030) were added and the plate stayed at room temperature for 15 to 20 min.

### *Capture ELISA technique*

Samples from Basin 1 of Farm 1 were mixed together and the amount required from each sample to complete a 150  $\mu$ l sample required for testing was obtained, while all the samples were processed as one single sample. The same method was followed for the samples from the other farms. The supernatants were diluted using a 3:4 ratio and were analysed using a CHEKIT-CSF-Virus-II commercial kit (Bommeli Diagnostics, Switzerland), following the method recommended by the manufacturer of the kit. This kit use specific monoclonal antibodies to detect EO (gp44/48) glycoprotein. This test manages certain parameters as percentage values to determine if the sample is positive, negative, or suspicious. When the value is lower than 30 %, the sample is negative. When the value falls between 30 % and 40 % the sample is ambiguous; and when it is higher that 40 % the sample is considered positive.

For each test, the percentages of positive solid, liquid and basin sludge samples were calculated using a descriptive statistical analysis method.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

Following the methodology previously described, it was possible to eliminate the toxic effect of faeces in cell culture monolayer, as shown by the absence of any indication of contamination in the cells 48 h after being exposed to the faeces, and the conditions of the cell monolayer. The isolated CSFv titre was  $10^{2.25}$  and the indirect immunoperoxidase test allowed to identify the virus in all the wells inoculated with a  $10^1$  dilution, and in three out of four wells inoculated with a  $10^2$  dilution during the test. This decrease in the reference viral titre before



contaminación a las 48 h posteriores a la exposición con las heces y el monoestrato se observó completo.

El título obtenido del virus de referencia recuperado fue de  $10^{2.25}$ , ya que se logró identificar éste en todos los pozos inoculados con la dilución de  $10^1$  y en 3 de los 4 pozos inoculados de la dilución  $10^2$  por medio de la prueba de inmunoperoxidasa indirecta. La disminución en el título del virus de referencia antes y después de la inoculación no fue tan marcada como la reportada por Turner *et al.*<sup>(14)</sup> quienes realizaron diluciones décuples de una suspensión de excretas-virus, donde el título del virus que utilizaron para inocular las heces fue de  $10^7$  DICC, y el título detectado posterior a la incubación en monoestratos celulares fue de  $10^{1.8}$ . La diferencia en la disminución de los títulos del virus posterior a la inoculación en heces entre el presente trabajo y el realizado por Turner *et al.*<sup>(14)</sup> pudo ser debida a que estos autores sometieron el inóculo a diferentes temperaturas que iban desde los 55 a los 70 °C.

Al realizar el análisis de las muestras por medio de las pruebas de inmunoperoxidasa e inmunofluorescencia, todas las muestras del cárcamo, del líquido obtenido del separador y del sólido resultaron negativas a la presencia del virus.

El no encontrar el vFPC en la mayoría de las muestras de las granjas evaluadas en el presente estudio es indicio por un lado, de una baja prevalencia, y por el otro de que el virus no sobrevive en grandes cantidades en el tipo de material analizado.

Si bien se ha aislado el vFPC a partir de excretas de cerdos a los 14 días postinfección<sup>(16)</sup> no se ha podido aislar de las excretas colectadas de los corrales 24 h después de despoblar<sup>(17)</sup>, lo que concuerda en cierta forma con lo encontrado en este estudio en la mayoría de las granjas analizadas, en las que no ha habido brotes recientes de FPC.

Entre las causas por las cuales en este trabajo no se pudo detectar al virus por medio de las pruebas de inmunoperoxidasa e inmunofluorescencia se pueden citar ciertas propiedades viricidas del estiércol, entre ellas se encuentra la actividad

and after inoculation was not as significant as that reported by Turner *et al.*<sup>(14)</sup>, who used decuple dilutions of a faeces-virus solution and a  $10^7$  CCID viral titre to inoculate the faeces. In that study, the post-incubation titre observed in cellular culture was  $10^{1.8}$ . The difference between our study and the study by Turner *et al.*<sup>(14)</sup>, regarding the reduction of the virus titre after inoculating the faeces, could be explained by the fact that these authors subjected the inoculum to different temperatures that went from 55 to 70 °C.

After analyzing the samples using immunoperoxidase and immunofluorescence tests, it was determined that all the samples from the basin, the liquid and solid samples from the separator, were negative to the presence of the virus.

The absence of CSFv in most of the samples from the farms evaluated in our study, serves to indicate that the virus has a low prevalence rate; and that the virus was not able to survive in significant amounts in the type of material analysed.

Even though the CSFv has been isolated from swine faeces 14 d after infection<sup>(16)</sup>; so far it has not been possible to isolate the virus from faeces collected 24 h after clearing the pens<sup>(17)</sup> before restocking. To some degree, these findings are similar to the findings from most of the farms included in our study.

The causes for failing to detect the presence of the virus by means of immunoperoxidase and immunofluorescence tests in our study include the existence of certain viricidal properties in the faeces, such as bacterial or proteolytic activity, as reported by Turner and Burton<sup>(3)</sup>. These authors suggest that viral inactivation in manure or a mix of waste water is caused by microbial activity inherent to this type of material and that, in many cases, the levels of some viruses are reduced by the addition of proteases, which demonstrates that proteolytic activity is partially responsible for this effect.

The ability of viruses to be adsorbed or adhered to faecal matter particles, could be another cause for failing to isolate the virus because it allows for

bacteriana o proteolítica, tal y como lo citan Turner y Burton<sup>(3)</sup>. Estos autores sugieren que la inactivación viral en excretas o mezcla de aguas residuales es causada por la actividad microbiana existente en este tipo de material; así mismo plantean que en muchos casos los niveles de algunos virus han sido reducidos por la adición de proteasas, demostrando que la actividad proteolítica es en parte responsable de este efecto.

Otra causa por la cual no se logró aislar el virus pudo ser debido a que estos son adsorbidos o se adhieren a las partículas de estiércol, y son removidos con el material sedimentado al momento de la centrifugación<sup>(2)</sup>.

Un componente viricida más que tiene el estiércol es el amoníaco; usualmente en el estiércol una porción pequeña de amoníaco está presente en forma de moléculas no ionizadas ( $\text{NH}_3$ ), las cuales se sabe tienen propiedades viricidas. Este efecto se demostró por la acidificación del estiércol a un pH de 6.5, en el cual los iones de amoníaco predominan. Al incrementar la temperatura, aumenta la producción de amoníaco, siendo éste el responsable de la inactivación viral. Esta actividad también se ve influenciada por el pH, para lo cual éste debe ser mayor a 8 y con esto el amoníaco puede tener un efecto viricida<sup>(3)</sup>.

De igual forma es importante tomar en cuenta que en ocasiones existen en los depósitos de excretas restos de los desinfectantes usados en las diferentes áreas de granjas, los cuales pueden tener un efecto adverso sobre los virus destruyéndolos o disminuyendo la cantidad de estos<sup>(3)</sup>.

Con respecto a la prueba de ELISA de captura, de las 16 muestras provenientes del cárcamo, 15 resultaron negativas (93.7 %) y una muestra correspondiente a la granja 1 resultó positiva a la presencia del virus de FPC (6.2 %). El valor obtenido para esta muestra fue de 53.9 %. Todas las muestras del líquido proveniente del separador, resultaron negativas a la presencia del vFPC. Cabe señalar, que la granja 1 no tenía brotes al momento del muestreo, y se estaba vacunando contra la fiebre porcina clásica con una vacuna de cepa PAV250.

them to be removed along with the sediment after centrifugation<sup>(2)</sup>.

Ammonia is another viricidal compound present in manure. Usually, a small amount of ammonia is present in the faeces, in the form of non-ionized molecules ( $\text{NH}_3$ ) which possess viricidal properties. This effect was demonstrated by the acidification of manure to a 6.5 pH value where ammonia ions are abundant. A temperature increase will also increase ammonia production, which is responsible for viral inactivation. The process may also be influenced by the pH value, which must be higher than 8.0 for ammonia to show any viricidal effect<sup>(3)</sup>.

Also, it is important to consider that sometimes, manure collection basins may also contain trace amounts of disinfectant agents used in different areas of the farm, which may have an adverse effect by either destroying or reducing the amount of viruses present<sup>(3)</sup>.

Results from the capture ELISA test showed that out of 16 basin sludge samples, 15 were negative (93.7 %); while one sample from Farm 1 was positive to the presence of CSF virus (6.2 %). The value obtained for this sample was 53.9 %. All the liquid samples from the liquid and solids separator were negative to the presence of CSFv. The farm one was not CSF outbreaks at sampling moment and was vaccinated with a stock PAV250.

Out of eight solid samples, only one sample, from Farm 1, was positive to the presence of CSF virus (12.5 %). The value for this sample was 50.4 %.

The fact of being able to detect positive samples using a capture ELISA test, and not by means of immunoperoxidase and immunofluorescence techniques, may be due to a higher level of specific sensitivity for CSFv in the ELISA test, because of the use of specific antibodies against gp44/48 glycoproteins present in the virus. This technique includes the use of microwell plates coated with specific antibodies against E0 glycoprotein, which is a viral envelope glycoprotein (gp44/48). If the glycoprotein is present in the sample, a specific link with the anti-glycoprotein antibodies present in the microwell plate will take place. The occurrence

De las ocho muestras de sólidos, sólo una proveniente de la granja 1 resultó positiva a la presencia del virus de FPC (12.5 %). El valor obtenido para esta muestra fue de 50.4 %.

El encontrar muestras positivas con la técnica de ELISA de captura y no con las técnicas inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa se puede deber a que la técnica de ELISA es más sensible y específica para la detección del vFPC, ya que los anticuerpos monoclonales que utiliza son específicos contra la glicoproteína E0 (gp44/48) que se encuentra presente en este virus. Esta técnica utiliza placas que se encuentran cubiertas con anticuerpos específicos contra la glicoproteína E0, la cual es una glicoproteína de envoltura (gp44/48). Si la glicoproteína se encuentra presente en la muestra habrá una unión específica con los anticuerpos anti-glicoproteína que se encuentran fijados en los pozos de la placa, y para evidenciar esta reacción se utiliza un conjugado anti-glicoproteína marcado con peroxidasa. Esta metodología no permite determinar si el virus identificado es de tipo vacunal o de campo.

El hecho de haber encontrado muestras positivas al vFPC no quiere decir que el virus estuviera viable. La prueba de ELISA de captura detecta la glicoproteína E0 del virus, y éstas pueden ser proteínas de membrana procedentes de virus destruidos por lo diferentes procesos de inactivación que se llevan a cabo en el estiércol. En el caso de sólo existir proteínas virales, las pruebas de inmunoperoxidasa e inmunofluorescencia resultan negativas, ya que éstas necesitan de la replicación del virus en el citoplasma de las células para que éste sea detectado.

Es importante citar que las muestras que resultaron positivas por la prueba de ELISA de captura pertenecen a una granja localizada en una zona porcícola donde el vFPC se encuentra de manera endémica en algunas piaras comerciales y de explotaciones de traspatio<sup>(18)</sup>. Y aunque en esta granja se estaba vacunando en el momento en que se hizo el muestreo, se ha mencionado que la vacunación no proporciona una protección absoluta, e incluso permite que el virus se establezca de

of this reaction is verified by the use of an anti-glycoprotein conjugate marked with peroxidase. This methodology it does not allow to determine if the identified virus is of type vacunal or field one.

Finding CSFv positive samples does not mean that the virus was viable. Antibody capture ELISA test is able to detect viral E0 glycoproteins which may be membrane proteins from viruses destroyed during any of the inactivation processes occurring in the manure mix. In cases where only viral proteins are present, immunoperoxidase and immunofluorescence tests will show negative results. For these tests to be able to detect the virus, the viral replication in the cellular cytoplasm must take place first.

It is important to note that all samples found positive through capture ELISA tests, were collected in a farm located in a swine rearing region with endemic presence of CSFv in some commercial and backyard swine rearing operations<sup>(18)</sup>. Although this farm had a vaccination program in place at the time of collecting the samples, it has been reported that vaccination does not provide full protection and may even allow the virus to become endemic in the infected herd. In addition, vaccination increases the infection threshold in pigs, but does not prevent infection and, when an infection occurs, it only serves to reduce the intensity of clinical manifestations and mortality and virus excretion rates<sup>(18)</sup>. However, this author found an effectiveness of the vaccine of 64 % without being able to determine to what it had smaller power of the vaccine when it was applied to farm level, presence of a factor causing immunosuppression, thus allowing the virus to infect a vaccinated herd and be transmitted by handling the animals or their faecal waste<sup>(18)</sup>.

This is consistent with the conditions found at the farm with positive results in our study, where a outbreak of PRRS had occurred in the service and gestation areas of the farm. However, the previous findings differs from the conclusions obtained in a work in where was demonstrated that to the pigs vaccinated with FPC vaccine stock PAV250 not they infected to the being defied by air route with a stock of vFPC (ALD)<sup>(19)</sup>.

manera endémica en la pira infectada; la vacunación aumenta el umbral de infección de los cerdos, pero no impide la infección, y cuando ésta ocurre, las manifestaciones clínicas, la mortalidad y la excreción de virus se reducen<sup>(18)</sup>. Este mismo autor encontró una eficacia de la vacuna de un 64 % sin poder determinar a qué se debió la menor potencia de la vacuna cuando se aplicaba a nivel de granja, pero asociándolo a la presencia de algún factor inmunosupresor, es por este motivo que el virus puede entrar a una pira vacunada y se puede difundir con el manejo de los animales o sus desechos<sup>(18)</sup>.

Lo anterior concuerda con las condiciones de la granja positiva, ya que en ésta antes del muestreo se habían presentado brotes de PRRS y SOA en el área de servicios y gestación. Sin embargo, lo anterior difiere de las conclusiones obtenidas en un trabajo en donde se demostró que los cerdos vacunados con vacuna de FPC cepa PAV250 no se infectaron al ser desafiados por vía aerógena con una cepa de vFPC (ALD)<sup>(19)</sup>.

Cuando se presenta un brote de FPC en una granja intensiva, un inconveniente aparte de los costos por concepto de mortalidad son las grandes cantidades de estiércol que puede estar contaminado. Este no puede ser manejado en la forma usual, es decir, para fertilizar tierras de cultivo o utilizarlo como alimento para los mismos animales, debido a que algunos virus pueden permanecer viables por largos periodos de tiempo en el estiércol, dependiendo de las condiciones de almacenamiento y su disposición; lo anterior es un riesgo de diseminación del virus en la misma granja o en granjas contiguas<sup>(14,20)</sup>.

Los niveles de virus presentes en el estiércol después de un brote para el caso de fiebre aftosa y la enfermedad de Aujeszky son bajos, tal vez  $10^2$ - $10^3$ ; esto debido a que no son enfermedades hemorrágicas, y las excretas de los animales enfermos no contienen grandes cantidades de sangre. En el caso de enfermedades hemorrágicas como la fiebre porcina africana se puede presentar un título de  $10^9$  TCID<sub>50</sub> ml<sup>-1</sup> en sangre. La fiebre porcina clásica es también una enfermedad hemorrágica, por lo que hay presencia de sangre en las heces, y si bien ésta no excede el 1% del volumen total del

In case of a disease outbreak in a farm with an intensive production system, the problems derived from financial losses caused by the increase in mortality rates are aggravated by the high amounts of potentially contaminated manure. If that is the case, it will be impossible to handle manure in the usual ways; that is, using it to fertilize crop fields or as part of the animal feed in the farm, due to the ability of some viruses to remain viable in manure for prolonged periods of time, depending of the storage and handling conditions; this circumstance poses the risk of disseminating the virus to other areas within the same farm, or to another farms in the vicinity<sup>(14,20)</sup>.

Virus levels in manure after an outbreak of Foot and Mouth Disease or Aujeszky's Disease are relatively low, perhaps in the order of  $10^2$ - $10^3$ . This is because they are not hemorrhagic diseases and the faeces of the affected animals do not contain a great amount of blood. For hemorrhagic diseases, such as African Swine Fever it is possible to observe a virus titre of  $10^9$  TCID<sub>50</sub> ml<sup>-1</sup> in blood. Classical Swine Fever is also a hemorrhagic disease that causes presence of blood in the faeces; and even when it does not exceed 1% of the total volume of faecal matter, a mean viral titre of  $10^7$  TCID<sub>50</sub> ml<sup>-1</sup> may be observed, nevertheless, there are no available data regarding the viral levels required for contaminated manure to be able to cause infection in pigs<sup>(14,21)</sup>.

## CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

Capture ELISA was more sensitive for detecting Classical Swine Fever virus, due to its ability to detect specific viral proteins; in this case, E0 glycoprotein. Direct immunoperoxidase and direct immunofluorescence tests failed to detect the virus, this does not mean that the virus was not present. Classical Swine Fever virus may be isolated from solid pig faeces and sludge samples from a sedimentation basin. However, this does not indicate that the virus is viable nor that the virus level is high enough to cause infection in pigs. It is recommended to treat solid and liquid manure in order to eliminate or reduce virus presence.

estiércol, pueden contener una media de  $10^7$  TCID<sub>50</sub> ml<sup>-1</sup>, sin embargo, no hay datos disponibles que mencionen los niveles requeridos para infectar a los cerdos a partir de estiércol contaminado<sup>(14,21)</sup>.

## CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

La prueba de ELISA de captura resultó tener más sensibilidad para detectar el virus de fiebre porcina clásica, debido a su capacidad para detectar proteínas específicas del virus, en este caso la glicoproteína E0. Las pruebas de inmunoperoxidasa directa e inmunofluorescencia directa no fueron capaces de detectar al virus, lo que no quiere decir que el virus no estuviera presente. El virus de fiebre porcina clásica puede ser aislado a partir excretas porcinas sólidas y de muestras del cárcamo, esto no indica que el virus es viable o que la cantidad de virus sea suficiente para infectar a los cerdos. Se recomienda dar algún tratamiento a las excretas sólidas y líquidas para eliminar o disminuir la presencia del virus.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el proyecto PAPIIT-UNAM número INI210997.

## LITERATURA CITADA

1. Zhu J. Solids-liquid separation. In Proceedings of the Allen D. Leman swine conference. University of Minnesota. St. Paul Mn. USA. 1999:205-210.
2. Haas R. Inactivation of viruses in liquid manure. Review Sci Tech. OIE 1995;14:435-445.
3. Turner C, Burton HC. The inactivation of viruses in pig slurries: a review. Biores Techn 1997;61:9-20.
4. Goddard CP, Powelson DK, Yahya MT, Wilson LG, Amy GL. Recovery of enteroviruses from raw and digested sewage sludges. J Agri Eng Res 1991;42(6):1023-1028.
5. Mengeling L, Paul PS. Interepizootic survival of porcine parvoviruses. J Am Vet Med Ass 1986;181:1293-1295.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the PAPIIT-UNAM project number INI210997.

*End of english version*

6. Iñiguez G. Aprovechamiento del estiércol de cerdo mediante fermentación. Nuestro Acontecer Porcino 1993;1:14-20.
7. Strauch G, Ballarini G. Hygienic aspects of the production and agricultural use of animal wastes. J Vet Med 1994;41:176-228.
8. Luckert PD, Allan GM. Porcine Circovirus. In: Straw BE *et al.* editors. Diseases of swine. 8<sup>th</sup> edition. Ames, Iowa, USA: Iowa State University Press; 1999:119-124.
9. Pensaert MB. Porcine epidemic diarrhea. In: Straw BE *et al.* editors. Diseases of swine. 8<sup>th</sup> edition. Ames, Iowa, USA: Iowa State University Press; 1999:179-186.
10. Moennig V. Introduction to classical swine fever: virus, disease and control policy. Vet Micro 2003;73:93-102.
11. Van Oirschot JT. Classical Swine Fever (Hog Cholera). In: Straw BE *et al.* editors. Diseases of swine. 8<sup>th</sup> edition. Ames, Iowa, USA: Iowa State University Press; 1999:159-172.
12. Edwards S, Fukusho A, Lefevre Pierre-Charles, Lipowski A, Pejsek Z, Roche P. *et al.* Classical swine fever: The global situation. Vet Microbiol 2000;73:103-119.
13. Edwards S. Survival and inactivation of classical swine fever virus. Vet Microbiol 2000;73:175-181.
14. Turner C., Williams SM, Cumby TR. The inactivation of foot and mouth disease, Aujeszky's disease and classical swine fever viruses in pig slurry. J App Micro 2000;89:760-767.
15. Monteith HD, Shanon EE. The inactivation of a bovine enterovirus and a bovine parvovirus in cattle manure by anaerobic digestion, heat treatment, gamma irradiation, ensilage and composting. J Hyg Camb 1986;97:175-184.
16. Moennig V, Floegel-niesmann G., Greiser-Wilke I. Clinical signs and epidemiology of classical swine fever: A review of new knowledge. Vet J 2003;165:11-20.
17. Dewulf J, Laevens H, Koenen F, Mintiens K, Kruif de A. Can classical swine fever be transmitted by excretions of infected pig?, Proceed 17<sup>th</sup> IPVS Congress, Ames, Iowa, USA, 2002:1.
18. Lozada GA. Estudio epidemiológico de la fiebre porcina clásica en granjas del altiplano de México. Téc Pecu Méx 2003;41(3):261-274.
19. Gonzalez SA. Transmisión del virus de la FPC por aire. Efecto de la vacunación con cepa PAV250 sobre la transmisión de FPC por aire [tesis maestría]. Cuautitlan Izcalli, Edo de México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2000.
20. Turner C; Williams SM; Wilkinson PJ. Recovery and assay of African swine fever and swine vesicular disease viruses from pig slurry. J App Microbiol 1999;87(3):447-453.
21. McVicar J. Quantitative aspects of the transmission of African swine fever. Am J Vet Res 1984;45(8):1535-1541.

