



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**Facultad de Estudios Superiores
" CUAUTITLAN "**

**"Estudio de los marcadores biológicos de virulencia
de las cepas de Aujeszky, aisladas de campo".**

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE :

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

Q U E P R E S E N T A :

GONZALEZ GALLARDO SOFIA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	Pags.
1.- Resumen.....	1
2.- Introducción.....	3
2.1. Definición.....	3
2.2. Etiología	3
2.2.1 Taxonomía	3
2.2.2. Características Fisicoquímicas	3
2.2.3. Propiedades antigénicas.....	4
2.2.4. Propiedades Biológicas	4
2.2.4.1. Selección del Hospedador.....	4
2.2.4.2. Cultivo celular	4
2.2.5. Latencia	5
2.2.6. Cepas.....	5
2.2.7. Resistencia	6
2.3. Epidemiología	6
2.4. Cepas	6
2.5. Patogénesis.....	9
2.6. Signos Clínicos	11
2.7. Importancia en México del virus de Aujeszky...12.	
3. Objetivos	14
4. Material y Metodos	
4.1. Cepas del virus de Aujeszky	15
4.2. Cultivo primario de Fibroblasto de embrión de pollo	15
4.3. Mantenimiento de Cultivos Celulares	17
4.4. Prueba de Sensibilidad a Temperatura	17
4.5. Prueba de Sensibilidad a Tripsina	18
4.5. Control de Cepas: Sin Tratamiento	18
4.7. Proceso de Atenuación de las cepas del virus de Aujeszky	19
4.8. Determinación de tamaño de placa	19
4.9. Titulación de las cepas del virus de Aujeszky ...	22
4.10. Prueba de media de tiempo de muerte en ratón(MTM22	

4.11. Prueba de Sensibilidad de las cepas del virus de Aujeszky en conejo	22
4.12. Técnica de Extracción de Antígenos soluble.....	24
4.13. Determinación de anticuerpos: por el método de doble difusión.....	25
5 Resultados	27
5.1. Tamaño de Placa de las cepas del virus de Aujeszkv	29
5.2. Análisis de tamaño de placa (ANOVA).....	30
5.3. Títulos de las cepas por DL ₅₀ en ratón	31
5.4. Media de tiempo de muerte en ratón (MTM).....	32
5.5. Análisis estadístico por ANOVA de MTM	33
5.6. Sensibilidad de las cepas de Aujeszkv en conejo: después del tratamiento	35
5.7. Sensibilidad de las cepas de Aujeszkv en conejo antes del tratamiento	34
5.8. Determinación de anticuerpos por doble difusión	36
6. Discusión	37
7. Conclusiones	40
8. Bibliografía	41

1 RESUMEN

En el ganado porcino la enfermedad de Aujeszky (pseudorrabia), tiene una gravedad clínica variable, siendo en ocasiones muy severa (convulsiones, coma y muerte en 24 horas) en animales de pocos días de edad y inaparente o subclínica en cerdos adultos, por lo que estos últimos representan la fuente potencial de infección para otros cerdos y para especies susceptibles (Adriens 1980, Kelling 1978. Mare, Mc Ferran 1982).

La pseudorrabia es considerada uno de los enemigos principales de la industria porcícola, debido a que ocasiona una baja en la capacidad de muchas hembras de quedar gestantes con aumento de mortinatos y/o momificados y la disminución en la conversión alimenticia (Kelling 1978. Thorner 1961).

La inmunidad contra el virus de Aujeszky, se desarrolla después de la infección natural y usualmente confiere una buena protección contra la reinfección (Terpstra 1982).

La pseudorrabia se caracteriza por causar trastornos nerviosos, prurito intenso en la zona de inoculación y un curso inevitablemente fatal, en la mayoría de las especies afectadas como: bovinos, ovinos, perros, gatos, zorras, conejos, etc. (Armbrecht 1982).

El uso de vacuna viva para inmunización contra Aujeszky, ha creado la necesidad de diferenciar entre cepas virulentas de no virulentas (Mc Ferran. Mc Crackend 1982). Esto tiene importancia para la epidemiología y control de la enfermedad no sólo en el cerdo, sino también en animales de otras especies.

En el presente estudio se trató de diferenciar cepas aisladas de campo de pulmones neumónicos de rastro: C-8, 145 y 215, junto con una cepa atenuada Shope, mediante la determinación de marcadores biológicos como son: tamaño de placa, sensibilidad a temperatura (56°C 30 minutos); sensibilidad a tripsina (0.5% tripsina, 30 minutos a 37°C), media de tiem

po de muerte en ratón (MTM) y sensibilidad a conejo. De donde se obtuvo que las pruebas de temperatura y tripsina no son pruebas diferenciales de las cepas; siendo más útiles - las pruebas de media de tiempo de muerte en ratón (MTM) y - sensibilidad en conejo.

2. INTRODUCCION

2.1. DEFINICIÓN

La enfermedad de Aujeszky o pseudorrabia, es un proceso infeccioso caracterizado por un cuadro clínico, de curso agudo y a menudo fatal para animales domésticos y salvajes causada por un virus del grupo Herpes.

Se caracteriza clínicamente por la manifestación de intenso prurito en la zona de penetración del virus, signos encefálicos puros y elevada morbilidad en lechones. En cerdos adultos se presenta como una enfermedad asintomática, mantenida en los animales, como portadores del virus por períodos que en ocasiones son prolongados (Pijoan y cols 1982).

La enfermedad fué descrita en Hungría en 1902 por Aujeszky, denominandose pseudorrabia, por su similitud clínica con la rabia (Bajk 1973). Esta enfermedad ha sido reportada en diversos países de Europa, Asia y América: en México se aisló por primera vez en 1971 de cerdos, aunque la enfermedad ya había sido descrita por Bacthold en 1945. (Martell y cols. 1971).

2.2. ETIOLOGIA

2.2.1. Taxonomía; Según el Comité Internacional el virus de Aujeszky o pseudorrabia, esta clasificado:

Familia: Herpesviridae.

Subfamilia: Alpha Herpesviridae.

Género: grupo I de los herpes virus suinos.

Especie: Herpes Suis I (pseudorrabia 1982) .

2.2.2. Características Fisicoquímicas: El virión tiene un peso molecular de 1×10^9 daltons (Matthews 1982) y densidad boyante en CsCl de 1.278 gr/cm^3 (Kaplan 1969, Lautie 1969).

El ácido nucléico del virus de Aujeszky es DNA de doble cadena con un 74% de guanina-citosina. El virión se compone de tres elementos estructurales: corazón o "core", la cáp

side, el tegumento y la envoltura. El corazón se observa al microscopio electrónico como un medio denso, en el centro de la partícula, que consiste en un ovillo fibrilar en el cual está enrollado el DNA. Los extremos de las fibras están anclados en la cara interna de la cápside. Esto se observa como una capa que rodea al corazón, y mide de 100-110 nm de diámetro; está formado por 162 capsómeros dispuestos en simetría icosaédrica. El tegumento que rodea a la cápside está constituido por un material globular que con frecuencia está asimétricamente distribuido y puede presentarse en cantidad variable. La envoltura está formada por una membrana que rodea al tegumento y tiene proyecciones superficiales de naturaleza glicoprotéica (Matthews 1982, Luria y cols 1978).

2.2.3. Propiedades antigénicas.: los virus del grupo herpes tienen una estructura compleja que hace difícil analizar y caracterizar las subunidades del virus, esto ha impedido relacionar estructura y función de los componentes del virión. Se sabe que el virus es capaz de producir una respuesta de anticuerpos neutralizantes después de la infección natural ó experimental (Baskerville y cols. 1973). Además se conoce que algunos componentes del virión, especialmente glicoproteínas mayores de la envoltura viral, son importantes en la neutralización. (Dalgard 1982, Pauli y cols 1982).

2.2.4 Propiedades Biológicas:

2.2.4.1. Selección del hospedador: el virus ha sido recuperado de gran variedad de especies domésticas como: cerdos bovinos, ovinos, perros, gatos, también en granjas de visón y zorras; en animales silvestres ha sido reportado en: liebre, visón, tejón, ratas, ratones; experimentalmente el virus puede ser transmitido por inoculación, a un amplio espectro de mamíferos excepto monos y reptiles (Gustafson - 1975).

2.2.4.2. Cultivo celular : el virus puede multiplicarse en una gran variedad de cultivos primarios, de diversos orígenes y en líneas continuas aunque no todos son igualmente sensibles (Mc Ferran y cols. 1972); aunque últimamente ha si

do considerado el cultivo primario de fibroblasto de embrión de pollo (Ursache y cols 1977).

El virus forma placas en distintos tipos de células y existe una relación lineal entre la cantidad de inóculo en el de número de placas producidas, aunque la eficiencia en la formación de placas, puede disminuir si existen polisacáridos sulfatados en el medio.

El virus de Aujeszky se disemina rápidamente en cultivos celulares lo que aunado a la destrucción masiva de células susceptibles, producen dos tipos de efectos citopáticos, uno caracterizado principalmente por la formación de sincitios y otro por la producción de células redondeadas altamente refráctiles y ocasionalmente con células gigantes (Kaplan 1969). La formación de sincitios, esta relacionada con una mayor virulencia de las cepas (Bitsch 1980). por otro lado, la ausencia de replicación, la fusión celular y a glutinación de las células ocurre rara vez (Matthews 1982).

2.2.5. Latencia: es una propiedad común a todos los virus de la familia herpesviridae que ha sido definida como la relación del virus con el huésped, en la cual la infección inicial es seguida de la persistencia del agente en el huésped probablemente de por vida. En la latencia, el virus sólo puede ser recuperado durante los periodos de reactivación de la infección. (Steven 1978).

2.2.6. Cepas: se esperaría que ciertas cepas del virus especialmente las de alta patogenicidad fueran excretadas en mayor cantidad y la transmisión aérea de éstas cepas puede descartarse (Bitsch y Andersen 1982). Hasta ahora no hay evidencia que relacione diseminación con virulencia ni se conocen cepas con sensibilidad variable a agentes fisicoquímicos que pudieran indicar mayor capacidad de diseminación.

Otro aspecto importante en la biología del virus es la existencia de cepas que presentan variaciones en virulencia signos clínicos, provocados por la capacidad de diseminación etc., que se han encontrado mediante diversas técnicas.

cas como: tamaño de placa en cultivo celular, resistencia a tripsina y temperatura, formación de sincitios y media de tiempo de muerte en ratón.

2.2.7. Resistencia: El virus es sensible a disolventes como: cloroformo, fluorocarbono, etc., detergentes como: el desoxicolato de sodio, tritón X-100, dodecil nitrato de sodio, nonidet P-40 etc., y a desinfectantes como: formalina, fenol, hipoclorito de sodio, etc., (Kaplan 1969); algunas cepas son sensibles a tripsina (Bartha 1969).

23. EPIDEMIOLOGIA:

La pseudorrabia es una enfermedad contagiosa, aguda y febril, en diciones naturales y puede ser reproducida mediante inoculación experimental por diversas vías (Baskerville cols. 1973).

El cerdo es la especie más afectada, aunque es la más resistente a la enfermedad, por lo que se considera como huésped natural del virus (Gustafson 1973). Por otro lado, el hecho de que el virus haya sido aislado de cerdos inmuⁿes y asintomáticos junto con la observación de que muchos focos ocurren en explotaciones aisladas. después del parto o por compra residente de hembras de repoblación clínicamente sanas, apunta al cerdo como principal reservorio de la enfermedad (Kojnok 1965).

Diversos autores coinciden en señalar que el virus puede transmitirse en cerdas, principalmente por secreciones orales y nasales y también por leche materna, semen, contacto venéreo, ingestión de carne de animales afectados y no parece ser transmitido por heces y orina, a excepción de algunas cepas aisladas en Estados Unidos (Kojnok 1965, Baskerville y cols 1973, Medviczky y Sabo 1982).

Otro aspecto importante, en la transmisión de la enfermedad, es la vacunación como causa de la difusión de la enfermedad, ya que en algunos casos inducen a pensar que la vacunación incontrolada esta cambiando la epidemiología de

la enfermedad y no limita la difusión del virus. Esto podría explicarse por la tendencia del virus a la latencia y por la dificultad para diferenciar anticuerpos vacunales y anticuerpos de infección de la enfermedad, lo que obscurece el diagnóstico.

Se ha establecido que en algunos casos, la infección por Aujeszky, se ha visto influenciada por el uso de equipo compartido de vehículo de granja, camiones de entrega y el hombre como vector mecánico. (Gustafson 1975).

2.4. Cepas del virus de Aujeszky

En los cerdos la infección presenta diversos signos clínicos, los signos nerviosos más o menos severos siempre presentes en algunos estadios de la infección natural y experimental. (Lautie 1969, Dow y Mc Ferran 1962). Existen numerosos reportes en donde los signos respiratorios, son la característica más importante (Baskerville y cols 1971, 1972, Chenev y Stoyanov 1958), considerándose que algunos virus pueden tener un tropismo más desarrollado hacia el tracto respiratorio (Kluge y Mare 1976).

También han sido observadas algunas diferencias en relación a la edad de los animales afectados en general se considera que la enfermedad natural afecta comunmente a los cerdos durante las cuatro primeras semanas de edad, presentándose una máxima mortalidad hasta las dos semanas y esta es mínima en cerdos de engorda y reproductores (Akkemans 1976, Baskerville 1981) Sin embargo algunos reproductores presentan cambios de virulencia con relación a la edad (Howath y de Paoli 1968).

La localización de lesiones en diversos órganos también presenta ciertas diferencias que aparecen principalmente en el sistema respiratorio (Dow y Mc Ferran 1962 Baskerville 1973); menos frecuentemente se han encontrado lesiones en glándula adrenal, miocardio, bazo, hígado, riñon, testículo y médula ósea (Baskerville y cols 1973).

La evidencia de la existencia de cepas variadas se ve claramente al realizar la inoculación experimental de los animales domésticos y de laboratorio, donde se observa la presentación de diversos grados de susceptibilidad, mortalidad y signología (Lautie 1969). Así se han aislado cepas espontáneamente atenuadas, como la cepa Vc aislada por Bartha en 1961, en un foco de la enfermedad de cerdos, o la cepa Such-1 aislada de cerdo por Skoda y cols 1964; y también la cepa aislada por Bodon y cols en 1969, de un foco de infección de cerdos con problemas respiratorios.

Se han obtenido cepas atenuadas experimentalmente, como la obtenida por Toneva en 1961, con virulencia aumentada para palomo, y disminuída para conejo, ratón y cerdo. También se han obtenido cepas atenuadas después de cientos de pases en cultivo primario de embrión o fibroblasto de embrión de pollo que generalmente implican ausencia de prurito en conejo (Skoda y cols 1964, Zuffa Povak 1965, Tatano 1974, Erceg vac Vasic 1974).

Toma en 1979, obtiene la cepa Alfort 26 termosensible que a 40.5 °C no se replica, esta característica constituye un marcador genético que permite distinguirla de otras cepas vacunales. Esta cepa fue derivada de un foco infeccioso en cerdos, mediante pases en cultivos celulares y con la técnica de diluciones límites, cultivada a temperaturas progresivamente más bajas. La termosensibilidad de esta cepa no se modificó después de diez pases en cerdo.

La existencia de cepas de campo que exhiben diversos grados de virulencia y comportamiento biológico y la introducción de cepas vivas atenuadas usadas para la vacunación, plantea la posibilidad de encontrar marcadores de virulencia específicos para las cepas. La disponibilidad de técnicas para la detección de marcadores podría ser de importancia en estudios de epizootiología y control de la enfermedad.

Respecto al tamaño de placa (Bartha 1961), La cepa vacunal K se diferencia de las cepas virulentas, porque produce

placas de pequeño tamaño en cultivos celulares. Aunque Sicola y cols 1964, observaron lo mismo, ellos compararon la cepa Buk atenuada artificialmente y la cepa Such-1 atenuada espontáneamente, con cepas virulentas y concluye que las cepas virulentas producen placas pequeñas en cultivo de fibroblasto de embrión de pollo, crecen lentamente y producen bajos títulos; las cepas no virulentas, crecen rápidamente y producen altos títulos y además placas grandes.

La acción citopática en cultivo celular, también ha sido propuesto como elemento para la diferenciación de cepas atenuadas o virulentas. Distintos autores han observado que las cepas naturalmente atenuadas y las vacunales, producen un efecto reducido en cultivo celular, que consiste principalmente en redondeamiento de las células mientras que las cepas virulentas producen sincitios. (Bartha 1961, Zuffa y Grielova 1966, Bodon y cols 1968 Bitsch 1980).

Por otro lado la aplicación de las pruebas de temperatura y de tripsina, parece que también podría tener cierta importancia en la diferenciación de cepas. Platt en 1979, comparó cepas de campo y dos cepas vacunales y observó marcadas diferencias entre ellas en cuanto a su resistencia a la prueba de tripsina y a la prueba de temperatura. Platt y cols en 1980, usando la prueba de tripsina, observándose diferencias, entre cepas virulentas y atenuadas, incluso reportaron que en esta prueba se presentaron diferencias frente a la prueba de temperatura entre cepas indistinguibles por su comportamiento.

25. PATOGENESIS.

En condiciones naturales se admite que la forma más común en que se establece la infección en cerdo es mediante la introducción o inhalación del virus en la cavidad nasal (Baskerville y cols. 1973), suponiéndose que el sitio primario de replicación se ubica en el tracto respiratorio superior (Wittman y cols. 1980 Mc Ferran y Dow 1965). Después de la infección experimental, el virus puede ser recuperado de las secreciones orales y nasales continuamente, durante diez días

(Mc Ferran y Dow 1964. Wittman y cols 1980)

Aparentemente el virus emigra desde la mucosa nasal (vía nervio olfatorio) y desde la mucosa faríngea (vía nervio glosofaríngeo. núcleo solitario de la médula o por terminaciones del nervio trigémino de la cavidad nasal y oral) a puentes y médula espinal (Mc Ferran y Dow 1965, Olander y cols 1966, Alva Valdes y cols. 1983). El virus emigra a través de fibras nerviosas por el axoma, mediante flujo axonal retrógrado, hacia los cuerpos neuronales de ganglios y hacia el sistema nervioso central (Dolivo y cols. 1978).

La diseminación del virus dentro del sistema nervioso central es rápida y, hacia el séptimo día pos-infección, todas las regiones del sistema nervioso central pueden contener virus, afectando todo tipo de células de vasos, neuronas y glía; el sistema nervioso central del cerdo parece ser resistente al efecto del virus de Aujeszky y en muchos casos, el animal sobrevive a la infección. La multiplicación del virus en el sistema nervioso central parece ser limitada. A partir del primer día pos-inoculación del virus no puede ser aislado del sistema nervioso central, la desaparición del virus coincidió con la aparición de anticuerpos neutralizantes en sangre. (Mc Ferran y Dow 1965).

En relación a la patogenicidad en el aparato respiratorio. se sugiere que en las primeras 24 horas después de la deposición del virus en la cavidad nasal del cerdo. este se multiplica activamente en mucosa nasal. faríngea y tonsilas. Probablemente las partículas son inhaladas directamente desde la nasofaringe hacia la tráquea y pulmón (Baskerville y cols 1973).

Las cepas que no producen lesión respiratoria marcada del virus han sido aisladas de mucosa traqueal desde el primer día, hasta el noveno día, mientras que en el pulmón se aísla el virus del tercero al noveno día pos-inoculación experimental (Dow y Mc Ferran 1962).

26. SIGNOS CLINICOS

La enfermedad en el cerdo está caracterizada por la pre

sencia de signos clínicos, lesiones macroscópicas y cambios histopatológicos en el sistema nervioso central (Baskerville y cols. 1983. Lautie 1969). pero, aunque estas manifestaciones estaban casi siempre presentes en algunos de la infección natural y experimental (Dow y Mc Ferran 1962, Olander y cols. 1978). también algunos autores han señalado que los signos respiratorios pueden ser la característica mas importante de la enfermedad (Baskerville y Mc Ferran 1971, Ghenevisto y Anov 1958. Lautie 1969).

En la infección natural, los signos clínicos pueden variar desde una forma leve con fiebre, acompañada de anorexia, ruidos nasales y bajo porcentaje de morbilidad (Baskerville y Dow 1972) hasta una forma severa con fiebre, anorexia, vómito y postración. Los signos nerviosos incluyen: excitación, incoordinación, paresia del tronco posterior, movimientos en círculo, convulsiones epilépticas, depresión en estadios terminales y alto índice de mortalidad (Dow y Mc Ferran 1962, Olander y cols. 1966)

Con respecto a la edad se considera, en general, que los lechones, hasta las dos semanas. presentan índices de mortalidad hasta del 100% y disminuye progresivamente, para presentar una mortalidad del 15% al 20% a las cinco semanas de edad (Baskerville y cols 1973), la signología de cerdos de engorda es difícil de describir, ya que presenta características subclínicas (Lautie 1969. Thawley y cols 1980). La presencia de manifestaciones subclínicas ha sido apoyada por estudios serológicos (Mc Ferran y cols 1982, Lenihan y O'Connor 1982), aunque en otros casos se presenta fiebre, inapetencia y ligeras manifestaciones nerviosas o. en otras ocasiones. se manifiestan como un problema pulmonar. acompañado de disnea (Lautie 1969). Además se señala que los signos más marcados en cerdos de engorda son las manifestaciones respiratorias acompañadas de somnolencia, en la mayoría de los casos la mortalidad en cerdos de engorda oscila entre 1% y 3% (Lautie 1969).

En reproductores la enfermedad puede pasar inadvertida, ya que las manifestaciones nerviosas son raras y normalmente se presenta sólo una ligera anorexia y fiebre; las secuelas pueden ser: abortos, nacidos muertos y momificaciones, normalmente se presentan hasta los diez días de iniciados los signos en las cerdas (Kwge v Mare 1974. Wohlgemuth y cols 1978 Thwley y cols 1980).

Los elementos que parece estar relacionados con la severidad de la enfermedad es la dosis del virus al infectar al cerdo (Baskerville 1972). se observa que la dosis está relacionada con el período de incubación, tiempo de aparición de fiebre, la gravedad de los signos, lesiones y el período de infección y muerte.

Por último, el estado inmune del animal puede modificar la signología . produciendo formas más leves de la enfermedad y mortalidad reducida (Koinok 1965, Mc Ferran y Dow 1973, 1975 Adries y cols 1978, Alva Valdes y cols 1983).

7. IMPORTANCIA EN MEXICO DEL VIRUS DE AUJESZKY

En México los primeros reportes fueron realizados por Bachtolden 1945, en bovinos; en 1973 se notificó un brote de Aujeszky en cerdos, en una granja del estado de Jalisco, en donde con frecuencia importaban pie de cría de los Estados Unidos; durante ese año y el siguiente la enfermedad prevaleció en la zona, provocando la muerte de 3600 lechones (Thorner 1961). La pseudorrabia se extendió en los primeros meses de 1975 a los estados de Michoacán, afectando hembras y causando la pérdida de 20 000 lechones (Thorner 1961).

En 1976 la región continuó sufriendo de la enfermedad de Aujeszky. pero la repercusión económica para los porcicultores fue menor debido a que la población se encontraba parcialmente inmune. Sin embargo, en 1978 al estudiar la serología, encontraron un alto predominio de anticuerpos frente a la enfermedad de Aujeszky, 25.8%, en los estados de Michoacán Guanajuato y Jalisco.

En 1982 Mercado y cols. observaron una alta incidencia de muestras positivas (12-75%), y un alto número de explotaciones afectadas variando desde el 12% al 100%; donde el estado más afectado fue Michoacán seguido de Guanajuato y Jalisco.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal planteado en este trabajo es el siguiente:

- 1.-Diferenciar varias cepas del virus de Aujeszky, aisladas de campo junto con una cepa atenuada como control Shope: mediante los marcadores biológicos de virulencia: antes y después de diez pases consecutivos en cultivo primario de fibroblasto de embrión de pollo.
- 2-Plantear una metodología de atenuación, de cepas de virus de Aujeszky. mediante diez pases consecutivos sobre fibroblasto de embrión de pollo. determinando esta atenuación - mediante los marcadores biológicos.

4. MATERIAL Y METODOS

4.1. Cepas del virus de Aujeszky.

Las cepas del virus de Aujeszky en estudio, fuerón cuatro: tres cepas aisladas del rastro de Cuautitlán estado de México, en la unidad de pos-grado de la FES-C (cepas 215. 145 C-8) y una cepa control Shope, con características de ser una cepa atenuada proporcionada por el departamento de epizootiología del INIF Palo Alto D.F.

4.2. Cultivo primario de Fibroblastos de Embrión de Pollo

2.1. Material: Para cultivo se utilizaron 10 embriones de pollo (proporcionados por Salsbury, S.A.); 24 botellas de leche estériles. un embudo con gasa estéril. un par de tijeras curvas estériles, un vaso de precipitado estéril, 10 tubos de centrifuga estériles, una cámara de Newbauer.

2.2. Soluciones: MEM-HLA* (10% de suero fetal de ternera irradiado con luz U.V. preparado en el laboratorio). 1% L-Glutamina. 1% de penicilina-estreptomicina* (sol. de penicilina - 100 U.I./ml y estreptomicina 1mcg/ml), tripsina* (sol. al 0.25% en amortiguador de fosfatos pH=7.2), azul de tripan 0.1% lugol.

2.3. Método

- 1.- Por medio de un ovoscopio, se verificó la viabilidad del embrión de pollo, y se indicó con una señal la posición de éste.
- 2.- Se sumergió el huevo en alcohol., y con un algodón empapado de lugol, se desinfectó la cámara de aire, del huevo, todo esto en zona de esterilidad.
- 3.- Se eliminó el cascarón y la fáfara de las cámaras de aire de los embriones, éstos fueron sacados y colocados en una caja de petri que contenía solución amortiguadora de fosfatos.
- 4.- Se lavaron dos veces los embriones con solución amortiguadora de fosfatos (pH=7.2).
- 5.- Se eliminaron: patas. pico, ojos y víceras de los embriones.

- 6.-Se lavaron dos veces con solución amortiguadora de fosfatos.
- 7.-Se retiró el remanente, colocándose en una jeringa estéril, se pasó al tripsinizador. que previamente contenía 25 ml de solución de tripsina.
- 8.-El macerado obtenido se puso en agitación 5 minutos, haciéndose pasar por un embudo. (eliminandose después el sobrenadante); posniéndose el remanente a tripsinizar durante 30 minutos.
- 9.-Se recogieron los sobrenadantes dejandose a 4°C, se repitió esto. hasta que se deshizo el tejido.
- 10.-Se centrifugó a 170 X g; 30 minutos.
- 11.-Se eliminaron los sobrenadantes y los sedimentos fueron resuspendidos en 5 ml de MEM-HIA* (con 10% de suero).
- 12.-Se contaron las células viables (de acuerdo a Hamish-Cu^{nninham}), se ajustaron a una concentración de 1×10^6 células por ml, en botella de dilución de leche; que posteriormente se le agregó 25 ml de MEM-HIA*.

* Grand Island Biological Company. Grand Island. New York (USA)

** Farmacéuticos Lakeside, S.A. de C.V. (México).

* Difco Laboratories. Michigan. (USA).

4| 3. Mantenimiento de Cultivos Celulares

3.1. Material: vaso de precipitado estéril.

3.2. Soluciones: MEM-HLA* con 5% de suero fetal de ternera estéril, solución amortiguadora de fosfatos pH=7.2.

3.3 Método

- 1.- Se eliminaron los medios de los cultivos celulares.
- 2.- Se agregaron 15 ml de solución amortiguadora de fosfatos (PBS(A)) , agitando ligeramente (se repitió dos veces).
- 3.- Se agregaron 25 ml de MEM-HLA* . a cada botella de leche y se observaron al microscópio los cultivos, incubándose hasta observar confluencia de los cultivos celulares.

4.4. Prueba de Sensibilidad a Temperatura

4.1. Material: Una botella de leche de cultivo primario de fibroblasto de embrión de pollo confluyente, por cepa de virus ; baño maría.

4.2. Soluciones: Solución amortiguadora de fosfatos (PBS(A)) MEM-HLA* con 2% de suero fetal de ternera.

4.3. Método:

- 1.- Una vez que los cultivos primarios de fibroblasto de embrión de pollo estuvieron confluentes, fueron lavados dos veces con PBS(A).
- 2.- Las cepas de virus fueron incubadas a 56 °C durante 30 minutos.
- 3.- Los cultivos primarios de fibroblastos de embrión de pollo, fueron infectados con 0.2 ml de la suspensión de las distintas cepas del virus de Aujeszky, incubándose durante media hora a 37°C.
- 4.- Fue eliminado el líquido de infección
- 5.- Fueron agregados 25 ml de MEM-HLA* con 2% de suero fetal de ternera(irradiado con U.V.)
- 6.- Se incubaron los cultivos infectados a 37°C, hasta aparición del efecto citopático.
- 7.- Una vez aparecido el efecto citopático, los cultivos fueron congelados a -70°C.

4.5. Prueba de Sensibilidad a Tripsina

5.1. Material: Cultivos de fibroblastos de embrión de pollo (una botella de leche por cepa); vaso de precipitado; baño maría.

5.2. Soluciones: Solución amortiguadora de fosfatos, MEM HLA* con 2% de suero fetal de ternera.

5.3. Método:

- 1.- Se incubó a 37°C, una solución de: 0.5 ml de suspensión de virus mas 0.5 ml de tripsina al 0.5%, durante 30 minutos, para cada una de las cepas.
- 2.- Los cultivos primarios fueron lavados dos veces con solución amortiguadora de fosfatos.
- 3.- Los monoestratos fueron infectados con 0.2 ml de suspensión de las cepas mas tripsina (paso #1), incubándose durante media hora a 37°C.
- 4.- Se eliminó el líquido de infección, y posteriormente se agregó MEM-HLA* (25 ml por botella de leche).
- 5.- Los monoestratos infectados fueron incubados a 37 °C hasta la aparición del efecto citopático.
- 6.- Los monoestratos infectados fueron congelados a -70 °C.

4.6. Control de Cepas : Sin Tratamiento.

6.1. Material: Cultivos de fibroblasto de embrión de pollo (una botella de leche por cepa); un vaso de precipitado;

6.2. Soluciones: Solución amortiguadora de fosfatos, - MEM-HLA* con 2% de suero fetal de ternera.

6.3. Método:

- 1.- Se lavaron los monoestratos de cultivo primario de fibroblasto de embrión de pollo, dos veces con solución amortiguadora de fosfatos.
- 2.- Se infectaron los monoestratos con 0.2 ml de suspensión de virus durante 30 minutos a 37°C.
- 3.- Se eliminaron los líquidos de infección de los monoestratos,
- 4.- A los monoestratos se les agregaron 25 ml de MEM-HLA* - con 2% de suero fetal de ternera irradiado con U.V. por

botella de leche.

5.-Se incubaron hasta la aparición del efecto citonático a 37 °C.

6.-Una vez aparecido el efecto citonático, los monoestratos infectados. fueron congelados a -70 °C.

4.7. Proceso de Atenuación de Las Cepas del Virus de Aujeszky.

Las cepas del virus de Aujeszky, fueron pasadas a través de diez pases consecutivos de cultivo primario de fibroblasto de embrión de pollo, en cada pase las cepas se trataron con tripsina ó temperatura junto con un tratamiento con trol (cepas sin tratamiento). Una vez producido el efecto citonático abundante en los monoestratos y antes de realizarse el siguiente pase el virus se liberó por lisis de células por congelación descongelación (-70 °C a 37°C tres veces consecutivas).

4.8. Determinación de Tamaño de Placa

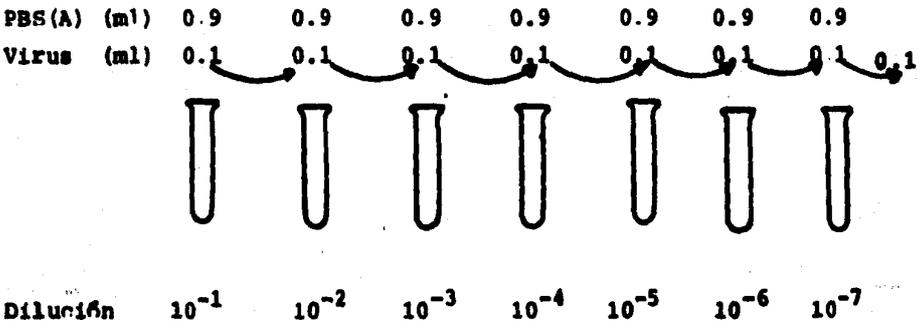
8.1. Material: 3 botellas Roux con línea celular confluentes, 7 tubos de centrifuga estériles, 210 cajas de petri falcon*; 90 tubos de ensave estériles. pinetas, un vaso de precipitado.

8.2. Soluciones: Solución amortiguadora de fosfatos pH= 7.2(PBS(A)), tripsina*- versene*** (solución de tripsina al 0.25% 5 ml: y versene 1% 0.4 ml y se lleva a un volumen total de 20 ml con PBS(A)): MEM-EARLE* (con sales de Eagle) suero fetal de ternera irradiado estéril. inactivado a 56°C, durante 30 minutos; 1% de L-glutamina* (sol. concentrada 100X); 1% de sol. penicilina-estreptomocina** (sol. de penicilina 100 U.I. y estreptomocina 1mg/ml). 1% niruvato* (sol. al 2.5%); agarosa al 1.5 % sol. amortiguadora de fosfatos-formol*** (10% de formol), sol. ciemsa**** (sol. al 20%).

8.3. Método:

1.- Las botellas Roux. con línea celular PK-15 confluentes: se lavaron con PBS(A), dos veces. Posteriormente se les agregaron 5 ml de solución de tripsina- versene, agitando hasta desprenderse todo el tñmiz

- 2.- La tripsina fué inactivada con Mem con 10% de suero, posteriormente centrifugandose a 170 xg, durante 30 minutos a 4 °C.
- 3.- Los sobrenadantes se eliminaron y los sedimentos se resuspendieron en 370 ml de MEM-EARLE* con 10% de suero fetal de ternera estéril e inactivado.
- 4.- Se colocaron 2.5 ml de suspensión de MEM-células, en cada una de las cajas de petri falcon®, inoculando así una concentración 1×10^4 células por caja.
- 5.- Las cajas falcon, fueron incubadas a 37°C, 48 hrs, en atmósfera de CO_2 (31.5 gr de CO_2),
- 6.- Una vez confluentes las cajas falcon fueron infectadas con diluciones logarítmicas (base 10), de las cepas de virus de Aujeszky, preparadas de la siguiente manera: trabajando en zona de esterilidad, fueron colocados 7 tubos de ensaye en una gradilla y se puso primero 0.9 ml de PBS(A), a cada uno de ellos. Para hacer las primeras diluciones de las cepas 215, C-8, 145 y Shope; se agitó la suspensión de virus y se tomó 0.1 ml y se añadió al tubo #1; este fué agitado, y se tomó 0.1 ml pasandose al tubo #2; procediendose así sucesivamente hasta terminar con el tubo #7, después de agitarse éste último tubo se tomó 0.1 ml y se eliminó igualando el volumen de todos los tubos. Todo esto se hizo para las cuatro cepas



- 7.- Fueron infectadas las cajas falcon con 0.1 ml de cada una de las diluciones de las cepas, usandose dos falcon por

dilución

- 8.-Las cajas falcon fueron incubadas una hora a 37°C en atmosfera de CO₂.
- 9.- Se preparó MEM-EAGLE 2X (medio preparado al doble de su concentración), adicionandole agarosa al 1.5%, en una proporción de 50% de cada uno.
- 10.-Se eliminó el líquido de infección de las cajas falcon*^o agregandoseles 2.5 ml de MEM-2X-agarosa por placa.
- 11.- Se incubaron durante cinco días, las cajas falcon; y al quinto día se les agregaron 2 ml de PBS(A)-formol, a la capa de agar formada, incubandose durante 12 horas a 4°C.
- 12.-Las cajas falcon se sacaron de incubación. agitandolas ligeramente, eliminandose el sobrenadante, y lavandolas con agua corriente, hasta que se desecho todo el agar de la caja falcon
- 13.-Las cajas falcon fueron secadas a temperatura ambiente
- 14.-Fueron teñidas con colorante de giemsa, durante una hora.
- 15.- Se lavaron con agua corriente, hasta que el agua salió clara.
- 16.-Se secaron a temperatura ambiente y posteriormente medidas y cuantificadas las unidades formadoras de placa

*^o EDTA

*^o FalconTM Div. Becton Dickenson. Co (BD) Oxnard California
93030 USA. (cajas de petri de 3.3cm de diámetro)

*^o Merck USA.

*^o Sioma de México S.A.

dilución

- 8.-Las cajas falcon fueron incubadas una hora a 37°C en atmosfera de CO₂.
- 9.- Se preparó MEM-EAGLE 2X (medio preparado al doble de su concentración), adicionandole agarosa al 1.5%, en una proporción de 50% de cada uno.
- 10.-Se eliminó el líquido de infección de las cajas falcon*^o agregandoseles 2.5 ml de MEM-2X-agarosa por placa.
- 11.- Se incubaron durante cinco días, las cajas falcon; y al quinto día se les agregaron 2 ml de PBS(A)-formol, a la capa de agar formada, incubandose durante 12 horas a 4°C.
- 12.-Las cajas falcon se sacaron de incubación. agitandolas ligeramente, eliminandose el sobrenadante, y lavandolas con agua corriente, hasta que se desecho todo el agar de la caja falcon
- 13.-Las cajas falcon fueron secadas a temperatura ambiente
- 14.-Fueron teñidas con colorante de giemsa, durante una hora.
- 15.- Se lavaron con agua corriente, hasta que el agua salió clara.
- 16.-Se secaron a temperatura ambiente y posteriormente medidas y cuantificadas las unidades formadoras de placa

** EDTA

** FalconTM Div. Becton Dickenson. Co (BD) Oxnard California
93030 USA. (cajas de petri de 3.3cm de diámetro)

*** Merck USA.

**** Sigma de México S.A.

4. 9. Titulación de las Cepas de Virus de Aujeszky

9.1. Unidades formadoras de Placa.

Esta técnica fué descrita anteriormente, en tamaño de placa; aquí solamente se hará mención que fué un método empleado para titular las cepas de virus de Aujeszky (C-8,145, 215 y Shope).

9.2. Dosis Letal en Ratón

9.2.1. Material: 72 tubos de ensaye, 72 pipeta, 72 jeringas de tuberculinas, 588 ratones cepa NIH-3 de 21 días de edad, solución amortiguadora de fosfatos pH=7.2.

9.2.2. Método:

- 1.-Se prepararon diluciones logarímicas de acuerdo a la metodología de tamaño de placa (paso #6)
- 2.-Con una jeringa, se tomó un ml de cada dilución, e inocularon 0.05 ml a siete ratones por dilución de virus, por vía intracerebral.
- 3.- Los ratones inoculados se mantubieron en observación, durante un período de 15 días, eliminando los muertos por traumatismo.
- 4.-Se realizaron los cálculos por el método de Reed y Muench (Hisung 1973).

4.10. Prueba de Media de Tiempo de Muerte en Ratón

10.1. Material: 56 ratones cepa NIH-3, de 21 días de edad, colocados en grupos de siete, usando dos grupos por cepa.

10.2. Método.

- 1.- De acuerdo al título obtenido por el método de DL₅₀ en ratón, de cada cepa, se inculó 0.05 ml vía intracerebral a cada ratón (14 ratones por cepa distribuidos en dos grupos de siete).
- 2.- Se consideraron los siguientes controles, en cada grupo, se inculó vía intracerebral dos ratones con solución de PBS(A) pH=7.2.
- 3.- se revisaron constantemente los ratones inoculados, midiéndose el tiempo de muerte de cada ratón,
- 4.- Se realizaron los cálculos necesarios de acuerdo a Platt y cols. 1980.

4. 11. Sensibilidad de las Cepas del Virus de Aujeszky en Conejo

11.1. Material: 12 jeringas de tuberculina. 60 tubos de ensaye estériles

riles, 60 pipetas estériles, 12 conejos de 21 días raza neolandesa blanco.

11.2. Método:

- 1.- Se realizaron diluciones logarítmicas de acuerdo a los títulos obtenidos en la titulación de las cepas por el método de DL_{50} en ratón.
- 2.- Se inculcó 1 ml por vía subcutánea, utilizando un conejo por cepa; (esta prueba se realizó para las cepas de virus antes y después de ser tratadas con temperatura y tripsina y a través de diez pasas sobre fibroblastos de embrión de pollo) ver cuadro # 6 y 7.
- 3.- Se mantuvieron en observación durante un período de 15 días en espera de la aparición de signos clínicos (rascado, irritabilidad y muerte).

4.12. Técnica de Extracción de Antígenos Solubles del Virus

12.1. Material: 1 botella de roux confluyente de fibroblastos de embrión de pollo, 2 basos de precipitado de 500 ml.

12.2. Soluciones: MEM-EAGLE (con sales de earle), polisorbato 80** (tween 80), sulfato de amonio.

12.3. Método:

- 1.-El cultivo primario de fibroblastos de embrión de pollo, confluyente, se infectó con virus de Aujeszky (1×10^7 UFP/ml)
- 2.- Una vez generado el efecto citopático, se eliminó el medio de mantenimiento (MEM con 2% de suero), de los cultivos, agregándosele 0.2 ml de polisorbato 80, poniéndose enseguida en el agitador orbital a 130 rpm, 37°C durante cuatro horas.
- 3.- Después se centrifugó a $200 \times g$ durante 15 minutos a 4 °C y por cada 20 ml de sobrenadante se añadieron 8.5 gr de sulfato de amonio. (agitando ligeramente). Cuando el precipitado se disolvió completamente, fue centrifugado a $3\ 000 \times g$, durante 30 minutos a 4 °C .
- 4.- Se descartó el líquido situado por debajo de la capa cremosa que se formó, la capa cremosa se resuspendió en 20 ml de solución de fosfatos pH=7.2.
- 5.-Para eliminar completamente el sulfato de amonio del extracto antigénico, éste se dializó frente a solución amortiguadora de fosfatos pH=7.2. durante 24 horas, cambiando repetidas veces de solución amortiguadora de fosfatos.
- 6.-Posteriormente el extracto antigénico se dializó 12 horas a 4 °C, contra agua destilada.
- 7.- Posteriormente el extracto antigénico se dializó 12 horas a 4 °C contra agua destilada.
- 8.- El dializado se congeló en alícuotas de 10 ml a -70 °C.

** Merck Co USA.

4-13. Determinación de Anticuerpos: Por el Método de doble difusión

Solución Teñidora:

Azúl de Coomassie Brillante R-250	1.25 gr
Metanol	227.0 ml
Ac. Acético Glacial	46.0 ml
Agua Destilada.....	227.0 ml

Se disolvió el colorante en la solución de metanol y agua, y se añdió ácido acético, eliminándose el material insoluble por filtración con papel Whatman #1, esta solución se guardó en botellas oscuras.

Solución Decolorante.

Etol Absolupto.....	1500ml
Acido Acético Glacial.....	50 ml
Agua Destilada	500 ml

Tampón Tris (Tris hidroxil metil amino metano 0.1 M (pH=8.2)
composición por litro.

Tris.....12.1 gr
aforar a un litro de agua destilada.

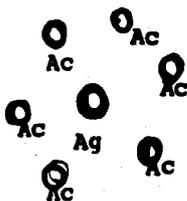
Ajustar a pH=8.2, con solución 3N de HCl .

13.2. Método:

- 1.- Se lavaron y limpiaron perfectamente, los vidrios de 7.5 X 6 cm.
- 2.-Se preparó agarosa al 0.65% con tampón (tris) diluido a la mitad.
- 3.-Sobre los vidrios se vació la agarosa, a una temperatura menor que la de ebullición, y se esperó a que gelificara, y con ayuda de un sa cabocados, fueron formados los pozos .
- 4.-Se colocó el antígeno en el pozo central, y alrededor de éste las di luciones dobles del suero (sueros de los conejos desafiados).
- 5.-Las diluciones dobles de los conejos desafiados fueron preparadas de la siguiente manera: en zona de esterilidad se colocaron siete tubos en una gradilla, colocándose primero 0.5 ml de PBS(A), y posterior-mentese agregó 0.5 ml de suero previamente agitado y se puso en el primer tubo, éste se tomó 0.5 ml una vez agitado y se pasó al tubo #2 y así sucesivamente hasta el tubo #7 en donde se eliminó 0.5 ml de la dilución para equilibrar volúmenes (agitando la solución en cada paso).

- 6.- Los geles se incubaron en cámara húmeda y revisaron durante 3 días.
- 7.-Se tiñieron durante 5 minutos. con solución teñidora.
- 8.-La solución teñidora se eliminó. agregandose la solución desteñidora entre 10-15 minutos.
- 9.-Se observaron las bandas de precipitación formadas contra la luz normal.

Diagrama de Doble Difusión



Título del virus de Aujeszky: 10^4 que se diluyó a 10^{-2}

5 RESULTADOS

Uno de los marcadores de virulencia medidos en éste estudio, fue el de tamaño de placa producida por las cepas del virus de Arjeszky: C-8, 145, 215 y Shope (ver cuadro #1). Al realizarse el análisis estadístico por ANOVA, y prueba de Tuckey (Hurley y Landeros 1980), con $P=0.05$ $\alpha=0.05$ (ver cuadro #2); las diferentes cepas de éste estudio manifestaron la siguiente relación:

$$215 > 145 = \text{Shope} > \text{C-8}$$

Los resultados muestran que si existe diferencia: significativa entre el tamaño de placa manifestado por las cepas en estudio; dicho análisis estadístico mostró que la cepa 215 presentó el tamaño de placa mayor, siguiéndole la cepa 145 y Shope y estas últimas presentaron igual tamaño de placa mientras que la C-8 presentó el menor tamaño de placa de las cuatro; lo cual sugiere que la cepa 215 es la menos virulenta y C-8 es la más virulenta.

Las cuatro cepas del virus de Arjeszky fueron sometidas a dos tratamientos: a) Sensibilidad a tripsina (0.5% de tripsina durante 30 minutos a 37°C) y b) Sensibilidad a Temperatura (30 minutos a 36°C), en cada uno de los casos llevando una cepa sin tratar como control; todas las cepas todas las cepas resistieron a este tratamiento.

En la siguiente etapa se procedió a titular las diferentes cepas por medio de la técnica de DL_{50} en ratón según Hsiung (1973): ver cuadro #3; de acuerdo a éste título se procedió a inocular los conejos y ratones. Para la prueba de media de tiempo de muerte en ratón (MTM) (ver cuadro #4) reportada por Platt en 1980. Esta fue determinada en éste estudio, y considerando lo dicho por éste autor, de que la prueba es altamente sensible y exacta para diferenciar entre cepas virulentas de no virulentas, y al realizarse el análisis estadístico por ANOVA (ver cuadro #5) las cepas presentaron la siguiente relación:

$$215 - \text{C-8} > \text{Shope} = 145$$

Observándose que si existe diferencia significativa, entre las cepas por medio del análisis estadístico, obtenemos que las cepas 215 y C-8

presentan el mismo MIM, pero este es mayor que el que presentan las cepas Shope y 145.

Otro de los marcadores de virulencia medidos fue el de sensibilidad a conejo para antes y después del tratamiento con los diez pases consecutivos sobre fibroblasto de embrión de pollo. (ver cuadro #6 y #7) al comparar los resultados observados vemos que los conejos desafiados con virus tratado no manifestaron prurito ni murieron, mientras que los conejos desafiados con cepas de virus no tratado manifestaron prurito y los desafiados con las cepas C-8 y 215 murieron.

Por último se determinó la presencia de anticuerpos en los sueros de los conejos desafiados con las cepas tratadas, por la técnica de doble difusión en agarosa (Wallenborg 1979) (ver cuadro #8), en donde vemos que la cepa 215 s/tratar fue la que produjo buena respuesta en conejo siguiéndole la 215 tripsina, 145 y Shope s/tratar siendo que la C-8 s/tratar casi no produjo respuesta y C-8 tripsina y temperatura son cepas que no produjeron respuesta en conejo.

CUADRO # 1

**Tamaño de Placa en mm en Línea celular PK-15 de las
Diferentes Cepas del Virus de
Aujeszky**

	C E P A S			
	SHOPE	215	C-8	145
X n=40	0.1779	0.216	0.133	0.177
n=40	0.1304	0.137	0.037	0.096

Después de inocular las cajas falcon confluentes con línea celular PK-15 0.1 ml de diluciones logarítmicas de las cepas del virus de Aujeszky, con un tiempo de incubación de cinco días, fueron medidas las unidades formadoras de placa en mm.

CUADRO # 2

Análisis de Varianza (ANOVA) de los datos presentados
en el cuadro # 1 para Tamaño de Placa

	GL	SC	CM	Fc
Tratamientos	3	0.1393	0.0464	17.21
Error	156	0.40425	0.00259	
Total	159	0.54357		

Significativa con $\alpha=0.05$ y $P=0.05$ en donde GL=grados de libertad
SC= suma de cuadrados, CM= media de cuadrados, Fc= F calculada. E
xiste diferencia significativa porque $F_c = 17.21 > F_t$

CUADRO # 3

Títulos de DL₅₀ en ratón de las cepas del Virus de Aujeszky

CEPAS	INICIO DE PASES	DESPUES DE DIEZ PASES TIPO DE TRATAMIENTO		
		s/tratamiento	temperatura	tripsina
C-8	10 ^{-4.5}	10 ^{-2.8}	10 ^{-3.8}	10 ^{-4.8}
215	10 ^{-3.2}	10 ^{-3.4}	10 ^{-3.4}	10 ^{-4.2}
Shope	10 ^{-8.7}	10 ^{-4.2}	10 ^{-2.3}	10 ^{5.3}
145	10 ^{-8.7}	10 ^{-2.5}	10 ^{-2.0}	10 ^{-4.3}

Se determinó DL₅₀ en ratón a las cepas de Aujeszky, antes y después del tratamiento con diez pases consecutivos sobre fibroblasto de embrión de pollo. Fueron utilizados ratones cepa NIH-3 de 21 días de edad, siete ratones por dilución y 56 por cepa, considerando los siguientes controles: 3 ratones inoculados con PBS(A) pH=7.2 por vía intracerebral, 0.02 ml.

CUADRO # 4**Prueba de Medía de Tiempo de Muerte en Ratón**

CEPA	RANGO (hrs)	$\bar{x} \pm s$
C-8	18-168	120.3 +/- 46.8
145	24-160	110.28 +/- 52.8
SHOPE	30-160	114.83 +/- 35.56
215	48-168	126.11 +/- 48.3

Se tomaron dos grupos de siete ratones, por cepa de virus de Aujeszky, y se inculó 0.02 ml vía intracerebral, de acuerdo a la máxima dosis obtenida en ratón.

CUADRO #5

Análisis de Varianza (ANOVA) de los Datos Presentados en el cuadro

#4 para Media de Tiempo de Muerte en Ratón (MM)

	GL	SC	CM	Fc
Tratamientos	3	14884	4961	3.864
Error	52	66763	1284	
Total	55	84532		

Significativa con $\alpha=0.05$ y $P=0.027$, GL=grados de libertad, SC= suma de cuadrados, CM= media de cuadrados Fc= F calculada; existe diferencia significativa ya que Fc es mayor que Ft (F de tablas).

CUADRO # 6

Sensibilidad de las Cepas del Virus de Artesky en Conejo
Antes del Tratamiento.

CEPA	PRURITO	SIGNOS NERVIOSA	SIGNOS RESPIRATORIOS	MUERTE
215	+++	+	--	si
C-8	++	+	--	si
Shope	+	+	---	no
145	+	+	--	no

Se utilizaron cuatro conejos por cepa de raza neolandesa blanco, destetados, inoculados por vía subcutánea a una dosis de acuerdo a la DI_{50} en ratón de las cepas sin tratar. -- (+) Signos positivos muy ligeros; (++) Signos positivos moderados; (+++) Signos positivos-notorios, (-) carencia de signos.

CUADRO # 7

Sensibilidad de la Cepas de Aujeszky en Conejo

Después del tratamiento.

CEPA	PRUEBA	PRURITO	CAÍDA DE PELO
215	s/trat	+	++++
	Trip.	+	+++
	Temperatura	-	++
145	s/trat.	-	++
	Trip.	-	+
	Temp.	-	+
SHOPE	s/Trat.	-	++
	Trip.	-	+
	Temp.	-	+
C-8	s/trat.	+	-
	Trip.	-	-
	Temp.	-	-

Se realizó con 12 conejos raza nueva Zelanda blanco, destetados e - inoculó 1ml de la máxima dilución obtenida por el método de DI_{50} en ratón. (+) Signos ligeros, (++) signos moderados, (+++) signos notorios, (++++) signos muy notorios. (-) carencia de signos.

CUADRO # 8

Determinación de Anticuerpos Por Doble Difusión en Agarosa

CEPA	215	145	Shope	C-8
s/tratamiento	1:32	1:16	1:16	SD
Tripaina	1:16	1:8	1:8	-
Temperatura	1:2	-	-	-

Se determinaron anticuerpos de los sueros de los conejos desafiados con las distintas cepas de Aujeszky, en estudio. (-) no presentó ningún título. (SD) suero sin diluir.

6. DISCUSION

El aumento de la incidencia de la enfermedad de Aujeszky en cerdos en México. así como el comportamiento epizootológico del virus (con variantes genéticas de cepas avirulentas o de baja patogenicidad) y la posible utilización de cepas vivas como vacuna han creado la necesidad de adoptar métodos que permitan diferenciar cepas aisladas de campo, ya sea de casos clínicos o no., de las cepas vivas vacunales.

En el presente trabajo se reprodujeron distintos marcadores de virulencia reportados en la literatura, en tres cepas del virus de Aujeszky aisladas de campo y una cepa atenuada como control, con el fin de estudiar en base a las pruebas diferenciales, la virulencia de estas cepas y así poder distinguir, a nivel de laboratorio. cuales de estos marcadores nos indican el tipo de cepa del virus de Aujeszky aislada.

Platt y cols (1979) encontraron que las cepas virulentas del virus de Aujeszky ocasionaban prurito y tiempos de muerte cortos (48-66hrs) en conejo; mientras que la cepa vacunal K no produjo prurito ni muerte en los conejos en ninguna de las dosis aplicadas. La cepa vacunal Buk no produjo prurito pero sí muerte de los conejos en un intervalo de tiempo de 2.3 a 2.7 veces más grande, que el de las cepas virulentas. Los resultados obtenidos en el presente estudio (cuadro #6) muestran que la cepa Shope produce prurito leve y no causa la muerte en conejo; la cepa 145 produjo signos similares a la Shope, lo cual podría indicar que se trata de una cepa vacunal o naturalmente atenuada. Los efectos producidos por las cepas C-8 y -215, son característicos de cepas virulentas, como se observa en el cuadro #6; sin embargo. estas cepas al ser pasadas a través de cultivo de fibroblasto de embrión de pollo, manifestaron un comportamiento diferente en conejo (aunque se usó únicamente un conejo por cepa). lo que parece indicar que las

cepas sufrieron un cambio en su patogenicidad (ver cuadro #7).

El tamaño de placa en cultivo de tejidos fue usado por Bartha y cols. (1961) como un marcador de virulencia, estos autores reportaron que las cepas virulentas producen placas de menor tamaño en cultivo de tejidos, aunque Skoda y cols. (1964) observaron lo contrario y Zuffa y Grielova (1966) no encontraron relación entre virulencia y tamaño de placa. En este trabajo se encontraron diferencias significativas ($P=0.05$) entre el tamaño de placa de las cuatro cepas (cuadro #2); las cepas 215 y C-8 fueron cepas virulentas en conejo (antes del tratamiento) y presentaron el tamaño de placa mayor y menor del grupo. lo que sugiere que este parámetro no está relacionado de manera determinante con la virulencia, lo que concuerda con los resultados de Zuffa y Grielova (1966). El hecho de que las cepas 145 y Shope presenten el mismo tamaño de placa y mismo efecto en conejo, indica que quizá se trate de la misma cepa.

Platt y cols (1980), encontraron que la media de tiempo de muerte en ratón (MTM) es una prueba diferencial que ofrece varias ventajas, como el bajo costo y fácil manejo de los ratones lo que permite utilizar un gran número de animales en cada estudio, además reportan que es una prueba que correlaciona con virulencia en cerdo. En este estudio los resultados coinciden en demostrar que las cepas C-8 y 215 con MTM de 114.83 y 126.11 respectivamente son similares en patogenicidad observándose igual comportamiento con las cepas 145 y Shope que presentaron un MTM de 106.20 y 92.3 respectivamente, y al parecer las cepas 215 y C-8 presentaron el mismo comportamiento entre ambas; del mismo modo que la 145 y Shope.

Arnaudo en 1975 estudió ocho cepas del virus de Aujeszky usando la prueba de tripsina y temperatura y observó que las cepas aisladas de cerebro de cerdos afectados de encefalitis fueron sensibles a las dos pruebas, mientras que las aisladas de pulmón neumónico fueron más resistentes, Platt (1979 1980) también usaron estas dos pruebas y concluyen que permiten diferenciar cepas virulentas y vacuneles pero no indican el -

grado de virulencia de las cepas. En este trabajo, los títulos obtenidos de las cuatro cepas antes del tratamiento fueron -- muy altos al compararlos con los obtenidos después del tratamiento, esta disminución del título fué indicativo de que las cepas sufrieron un proceso de atenuación. Al comparar el tratamiento con temperatura, presentaron el mismo comportamiento las cepas con el control; lo que sugiere que la temperatura no tiene acción sobre las cepas del virus de Aujeszky. al menos las empleadas en este estudio. Sin embargo la tripsina; al comparar los títulos vemos que estos se mantienen por encima de los de las cepas control y semejante a los obtenidos en las cepas antes del tratamiento: lo cual sugiere que la tripsina impide el proceso de atenuación en las cepas y posiblemente la tripsina pudiera actuar a nivel de envoltura, afectando la penetración del virus a la célula.

Al determinar anticuerpos de los conejos desafiados, se puede observar que la cepa que produjo mejor respuesta de anticuerpos fué la 215 (título de 1:32). mientras que la C-8 - produjo títulos mínimos (1:2); sin embargo las cepas 145 y Shope presentaron comportamiento inmunológico similar (título - 1:16), lo que sugiere que la cepa 215 es la más inmunológica, pero los resultados no pueden ser concluyentes ya que solo se usó un conejo por cepa, por lo que sería necesario repetir las pruebas de sensibilidad en conejo para después del tratamiento y determinar anticuerpos.

VII Conclusiones

Entre las pruebas realizadas para la diferenciación de cepas, vemos que la prueba de tripsina y temperatura, no son pruebas diferenciales de cepas del virus de Aujeszky; siendo más útiles en la diferenciación de cepas virulentas de no virulentas, las pruebas: media de tiempo de muerte en ratón (MTM) y sensibilidad a conejo.

En base al análisis estadístico de las cepas de Aujeszky, aisladas de campo (rastros de Cuautitlán FES-C), realizado a las pruebas de: tamaño de placa y media de tiempo de muerte en ratón (MTM), y corroborado por la prueba de sensibilidad a conejo de las cepas, vemos que estas son cepas no virulentas que presentan ciertos grados de diferencia entre ellas.

Comparando los resultados obtenidos en la prueba de sensibilidad a conejo, antes y después del tratamiento con tripsina y temperatura a través de diez pases en cultivo primario de fibroblastos de embrión de pollo, vemos que la propiedad de las cepas de Aujeszky de producir prurito en conejo se pierde al ser pasadas éstas cepas a través de cultivo primario de fibroblastos de embrión de pollo.

- 1.-Akkermans, J.P.W.M. (1976). Aujeszky's disease. *Ann. Med. Vet.* 120. (5): 295-306.
- 2.-Alva-Valdez, R.; Glock, R.D. (1983). Effects of vaccination on lesion development in pseudorabies virus challenged swine. *Am J. Vet. Res.* 44(4): 558-596.
- 3.-Arnaudov, K. (1975). Use of temperature, trypsin and a biological test for the intraspecific differentiation of field strains of Aujeszky's disease virus. *Vet. Med. Nauki* 120(6): 57-67.
- 4.-Bachtold, H.; (1945), citado por: Martell, M.; Alcocer, F.; Cerón, J. L.; Aislamiento y caracterización del virus de la enfermedad de Aujeszky ó Pseudorrabia en México. *Tec. Pec.* 18: 27-31.
- 5.-Bartha, A. (1961). Attempts at attenuating the virulence of Aujeszky's disease virus. *Magy Allatoros Lap.* 16: 42-45.
- 6.-Baskerville, A.; (1972a). The influence of dose of virus on the clinical signs in the experimental of the Aujeszky's disease in pigs. *Br. Vet. J.* 138: 394.
- 7.-Baskerville, A.; McCracken (1971). The histopathology of experimental rhinitis in pigs, produced by a strains of Aujeszky's-disease virus. *Res. Vet. J.* 12: 323-326.
- 8.-Baskerville, A. (1973a). The histopathology of experimental pneumonia in pig produced by Aujeszky's disease virus. *Res. Vet. Sci.* 14: 223-228.
- 9.-Baskerville, A. (1981). Aujeszky's disease, recent advances and current problems. *N.Z. Vet. J.* 29(10): 183-185.
- 10.-Beran, C.W.; Davis, E.E.; (1980). Persistence of pseudorabies virus in infected swine. *J.A.M.A.* 176: 998-1007.
- 11.-Bitsch, V. (1980). Correlation between the pathogenicity of field strains of Aujeszky's disease virus and the ability to come call fusion syncytio formation in cell culture. *Act. Vet. Scand.* 21: 708-719.
- 12.-Bodon, L.; Mezarós, (1968). Properties of Aujeszky's disease virus strains isolated from swine pneumonia cases. *Act. Vet. Acad. Sci.* 18: 107-109.
- 13.-Bran, L.; Suhaci, I.; Ursache, R. (1968). Experimental production of Aujeszky's disease by nasal instillation of culture virus

Arch.Vet.5:83-87.

- 14 J.-Bran, L. (1974). Le vaccin roumain a virus avianise contre la - maladie d'Aujeszky. Can.Méd.Vét.43:333-336.
15. -Bitsch, V. (1975). A study of outbreak's on Aujeszky's disease - in cattle. Act.Vet.Scand.16:420-423.
16. -Cumming, Hamisch (1970). Tissue Culture. Bultirworth & Co. LTD 88 Kin sway, London WC2B, 6AB, England: 68-71.
17. -Dow, C.; McFerran, J.B. (1972). The neuropathology of Aujeszky's - disease in the pig. Res.Vet.Sci.3:436.
18. -Fraser, G.; Sakkubai, (1969). Studies on the virus of Aujeszky's disease in the pig. Res.Vet.Sci.43:435-443.
19. -Gustafson, D.P. (1975). Pseudorabies In: Disease of swines. H.W. - Dunne and A.D. Lemann (eds.), 4th Iowa state Univ. Press.: 391-410
20. -Howarth, G.A. (1968). An enzootic of pseudorabies in swine in - California. J.A.M.A. 152:114- 118.
21. -Hitosi, Goto, (1971). Quantitative studies of pseudorabies vi - rus in minks, ferrets, rabbits, mice. Jap.J.Vet.Sci.33:145-153.
22. -Hisung, G.D. (1973). Diagnostic Virology, an illustrated handbook Yale university Press.: 21-22.
23. -Lautie, R. (1969). La maladie d'Aujeszky. Maladies d'animale a - - virus . Ed. Exp. Sci. Franc.
24. -Luria, S.E.; Darnell, J.E. (1978). Animal virus multiplication - - DNA viruses and retroviruses. General Virology, 3th Edition . 343-389.
25. -Kerkbride, C.A. (1978). Infectious agents associated with fetal - and early neonatal death and abortion in swine. JAm.Vet.Asso. 172:(4):480-483.
26. -More, J.P. (1977). Aujeszky's disease im swine. Vet.Med./small a - nimal, Clin.Agri.Practice:480-483.
27. -Martell, M.D.; Alcocer, B.; Cerón, L.; DelValle, P.; Auro, A. (1971). - Aislamiento y caracterización del virus de la enfermedad de A ujeszky ó pseudorabia de México. Tec. Pec. 18:27-31.
28. -McFerran, J.B.; Dow, C. (1976). The distribution of the virus of - Aujeszky's disease (pseudorabies virus) in experimental infec

- ted swine. *Am. Vet. Res.* 26:631-635.
- 29.-McFerran, J.B.; McCracken, (1982). Comparative studies with inactivated and attenuating vaccines for protection of fattening-pigs. G. Witmann, S.A. Hall. Luxemburgo.
- 30.-McFerran, J.B.; Dow, C. (1979). Experimental studies in weaned pig with three vaccines against Aujeszky's disease. *Comm. Immunol. Microbiol. Inf. Dis.* 2:327-334.
- 31.-McFerran, J.B.; McCracken, R.M. (1980). Comparative studies with inactivated and attenuating vaccines for protection of fattening-pigs in Aujeszky's disease. G. Witmann, S.A. Hall. Luxemburgo.
- 32.-Olander, H.L.; Saunders, J.R. (1966). Pathologic findings in swine affected with a virulence strain of Aujeszky's disease. *Pathol. Vet.* 3:64-82.
- 33.-Platt, K.B.; Mare, C.J. (1979). Differentiation of vaccine strains and field isolated of pseudorabies virus: Thermal sensitive and rabbit virulence markers. *Arch. Virol.* 60:13-23.
- 34.-Platt, K.B. (1981). Genetic stability of thermal tryptic rabbits and mouse markers of Aujeszky's disease (pseudorabies) virus in pigs. *Vet. Microbiol.* 6:225-232.
- 35.-Roszkowsky, J. (1978). Use of immunoenzyme technique for detection of Aujeszky's disease virus in cell culture. *Vet. Res.* 102: 463-464.
- 36.-Sabó, A. (1969). Persistence of perorally administered virulent pseudorabies virus in the organism of non-immune and immunized pig. *Act. Virol.* 13:269-277.
- 37.-Skoda, R.; Brauner, T.; Sadky, E.; Mayer, (1969). Immunization against

- nst Aujeszky's disease with live vaccine, attenuating of virus and some propieties of attenuated strains. *Act. Virol.* 8:1-9.
- 38.-Stevens, J.B. (1971). Latent herpes simplex virus in spinal ganglia of mice. *Sci.* 173:843-845.
- 39.-Thawlw, D.G.; Wright, J.C. (1980). Epidemiologic monitoring following an episode of pseudorabies involving swine in sheep and cattle. *J.A.U.M.A.* 176:1001-1003.
- 40.-Tomas, B. (1977). Moddiffication of strains of Aujeszky's disease virus in cell culture. *J. Resc. P. Franc.* 453:544-567.
- 41.-Tomas, B. (1979b). Propierteis biologique d'unne souché thermosensible (Alfrot26) de virus de la maladie d'Aujeszky. *Res. Méd. Vét.* 155:245-252.
- 42.-Ttarov, G. (1968). Apathogener mutant des Aujeszky virus induziert von 5-iodo-2-deoxiuridin. *Zend. J. Vet. Med.* 15:847-853.
- 43.-Ttarov, G. (1981). An avirulent mutant of the Aujeszky's disease virus obtained under the effect of 5-bromo-deoxiuridin. *Vet. Med. Nauky.* 18:3-12.
- 44.-Toneva, V. (1969). Obtention d'unne suoche virulente du virus de la maladie d'Aujeszky au moyen de pasajes et de adaptation des pegeons. *C.R. Acad. Bulg. Sci.* 14:23-31.
- 45.-Tozzini, F. (1982) Characteristic of field and modified disease virus strains in: Aujeszky's disease. Witmann, S.A. Hall. Luxemburgo.
- 46.-Vanier, P. (1980). Efficiency of an inactivated virus vacine against Aujeszky's disease for fattening pigs, with or without pasive immunity. Witmann S.A. Hall. Luxemburgo.
- 47.-Van Oesrhot, J.T. (1982). Early protection after vaccination against Aujeszky's diase. Witmann, S.A. Hall. Luxemburgo.
- 48.-Veselinova, A. (1981). Comparative morphologic studies of pig infected with differents strains of the pseudorabies virus. *Vet. Med. Nauky* 18:17-24.
- 49.-Wallenborg and Ulla-Bergite-Anderson. (1979). Inmmunoelectrophoretics techniques with the LKB-2117 multiphor, applicattion of laboratory LKB-producter ABBromma, Sweden.
- 50.-Witmann, G.; Jakubik, J. (1980). Multiplication and distribution of virus Aujeszky (pseudorabies), virus in vaccinated and non-vaccinated pigs afetr intranasal infection. *Arch. Virol.* 66:227-240.

- 52.- Witmann, G. ; Jakubik, J. (1979). Colostral immunity in pigs from sows vaccinated with inactivated Aujeszky's disease virus vaccine. Arch. Virol. 60 : 33-42.
- 53.- Zuffa, A.; GGriellova K (1966). Immunisierung gegen die Aujeszky'sche Krankheit II, studium der zytopathogenität und -plaquen morphologie verschieden virusstammebezuglicher virulenz für schweine. Arch Exp. Vet. Med' 20: 127-140.
- 54.- Zuffa, A. Polak L. (1965). Immunoprofilaxie de certaines maladies a virus du porc et des volailles in Tchécoslovaquie Bull.Int. Epizootic. 64: 297-307.