

19
2-ef.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

"CURVA DE MULTIPLICACION DEL Paramyxovirus
PORCINO LPM EN LA LINEA CELULAR PK-15,
CON BASE EN EL TITULO VIRAL,
DETERMINADO POR HEMAGLUTINACION
Y POR EFECTO CITOPATICO".

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :
ANTONIO COLINAS TOVAR

Asesores: E. Pablo Correa Girón, M.V.Z., M.A.
Atalo C. Martínez Lara, M.V.Z.

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1989

FALLA DE ORIGEN



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

| | |
|-----------------------------------------------------------|----|
| INDICE DE ABREVIATURAS | 1 |
| RESUMEN | 1 |
| INTRODUCCION | 2 |
| SINDROME DEL OJO AZUL | |
| a. Antecedentes | 3 |
| b. Etiologia | 5 |
| c. Características del virus LPM | 6 |
| d. Distribución | 8 |
| e. Especies afectadas | 10 |
| f. Signos clínicos | 12 |
| g. Morbilidad y Mortalidad | 17 |
| h. Cambios macroscópicos | 19 |
| i. Cambios histológicos | 20 |
| j. Anticuerpos en el calostro | 21 |
| k. Transmisión entre granjas | 22 |
| l. Persistencia del virus | 23 |
| m. Diagnóstico | 23 |
| n. Prevención | 24 |
| o. Características principales de los Paramixovirus | 24 |
| p. Multiplicación de los virus | 27 |
| q. Fases de la multiplicación | 28 |
| r. Efecto citopático | 32 |
| s. Hemaglutinación | 33 |
| t. Células PK-15 | 34 |
| | |
| OBJETIVOS | 35 |
| MATERIAL Y METODOS | 36 |
| RESULTADOS | 45 |
| DISCUSION | 59 |
| CONCLUSIONES | 67 |
| APENDICE I | 69 |
| BIBLIOGRAFIA | 70 |

INDICE DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| ADN | .- Acido Desoxirribonucléico |
| ALVEC | .- Asociación Latina de Veterinarios Especialistas en cerdos. |
| AMM | .- Asociación Mexicana de Microbiología. |
| AMVEC | .- Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos . |
| ARN | .- Acido Ribonucléico. |
| ARN _m | .- Acido Ribonucléico mensajero. |
| BSS | .- Solución Salina Balanceada. |
| C | .- Grados Centígrados. |
| CB | .- Células de Cornete de Bovino (línea celular). |
| CENID-M | .- Centro Nacional de Investigaciones Diciplinarias en Microbiología. |
| cm ³ | .- centímetro cúbico. |
| DFEC | .- Dosis Formadoras de Efecto Citopático 50%. |
| dif. 50 | .- diferentes. |
| DL | .- de Dilución de Leche. |
| ECP | .- Efecto Citopático. |
| EUA | .- Estados Unidos de América. |
| Exp. | .- Experimento. |
| g | .- gramos. |
| xG | .- Gravedades. |
| h | .- horas |
| HA | .- Hemaglutinación o Hemaglutinante. |
| HE | .- Hematoxilina y Eosina. |
| IC | .- Intracitoplásmicas. |
| IH | .- Inhibidores de la Hemaglutinación. |
| IM | .- Intramuscular. |
| IN | .- Intranasal. |
| INIFAP | .- Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. |
| INIP | .- Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias. |
| IR | .- Intermediario Replicante. |
| IT | .- Intratraqueal. |
| IV | .- Intravenosa. |
| Lab. | .- Laboratorio. |
| Log ₁₀ | .- Logaritmo de base 10. |

LPM .- Paramixovirus porcino de La Piedad, Michoacán.
 MEM .- Minimum Essential Medium.
 MI .- Multiplicidad de Infección.
 min .- minuto o minutos.
 ml .- mililitros..
 mp .- milimicras.
 nm .- nanómetros.
 No. .- Número.
 Obs. .- Observación.
 OC .- Opacidad de la Córnea.
 pH .- Concentración del ión H_3O^{1+} y del ión $OH^{1(-)}$
 PI .- Postinoculación.
 PIV-3 .- Virus de Parainfluenza bovina Tipo 3.
 PK-15 .- Células de Riñón de Cerdo (línea celular).
 PM .- Peso Molecular.
 PMs .- Pesos Moleculares.
 r.p.m. .- revoluciones por minuto.
 SARH .- Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos.
 SC .- Subcutánea.
 SNC .- Sistema Nervioso Central.
 SOA .- Síndrome del Ojo Azul.
 SS .- Solución Salina.
 TCID₅₀ .- Dosis Infectantes en Cultivos Celulares 50%.
 TL .- Tubos de Leighton.
 UHA .- Unidad Hemoaglutinante.
 UHIA .- Unidades Inhibidoras de la Hemoaglutinación.
 UNPC .- Unión Nacional de Porcicultores.
 vs. .- (verse, versus): contra, en comparación con.
 VSDA .- Virus del Síndrome del Ojo Azul.

RESUMEN.

En 1984, a partir del cerebro de un cerdo con signos nerviosos, y opacidad de la córnea, procedente del área de La Piedad, Michoacán, correspondiente a un brote con 15-20% de mortalidad, se aisló un virus que mostró propiedades hemaglutinantes y morfología parecida a la de los Paramyxovirus. En 1986 fue caracterizado y denominado Paramyxovirus porcino de La Piedad, Michoacán (LPM). El presente trabajo se hizo con la finalidad de conocer la curva de multiplicación de este virus LPM, en células PK-15. Estas se infectaron con dif. dosis del virus LPM, monoestratos contenidos en tubos de Leighton (TL) con laminilla (Experimento A), TL sin laminilla (Experimento B) y botellas de dilución de leche (Experimento C). En cada experimento, uno o dos monoestratos fueron sacrificados (congelándolos a -70 C) a diferentes intervalos, durante 9.75 días PI, en el Exp. A; durante 10.25 días en el Exp. B; y durante 12.2 días en el Exp. C. En el Exp. B, la laminilla, conteniendo el monoestrato, fue fijada y teñida con HE. Todos los especímenes colectados de cada experimento, fueron titulados por hemaglutinación (HA) y por efecto citopático (ECP), en microplacas. Se encontró que el ECP se inició entre los 1.25-1.7 días PI y fue completo entre los 6.25 y 7.4 días PI. Los máximos títulos por ECP se obtuvieron aproximadamente entre los 2 y los 4 días PI. Los títulos más altos por HA, se encontraron a partir de los 6-7 días PI. Sin embargo, en el Exp. C, fue posible obtener un buen título por HA a partir de los 2.7 días. El periodo de latencia del virus LPM es de aproximadamente 17-18 h. No siempre hubo correlación entre el alto título viral y el alto grado de ECP observado en los monoestratos. Ni entre el alto título detectado por ECP y por HA.

INTRODUCCION

Debido a sus características biológicas y económicas los cerdos se crían y utilizan en diversas partes del mundo desde tiempo inmemorial. La alta capacidad reproductiva del cerdo, su rápido ritmo de engorda y su relativamente alta capacidad para transformar los alimentos, lo ubican en primer lugar a nivel mundial en la producción de carne (31).

Actualmente la mayor parte de los cerdos se crían en Asia, correspondiendo a China un 80% del inventario de la zona; en segundo lugar se encuentra Europa donde la U.R.S.S. participa con un 30%. En cuatro grandes países: China, URSS, EUA y Brasil, se localiza el 63% de la cría mundial de cerdos. Sin embargo, los principales países productores, consumidores y comercializadores de carne de cerdo se encuentran, en contadas excepciones, en Europa y América del Norte (31).

A pesar de que México ocupa un importante lugar, a nivel mundial, por la magnitud de su inventario y por el volumen de su producción, la relación porcentual entre el inventario porcino y la magnitud de la matanza, lo que se denomina tasa de extracción, en un momento determinado es relativamente baja (90%), en comparación con los países que tienen una porcicultura avanzada (31). Según cifras de la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH), a partir de 1975, los cerdos se convierten en el sistema ganadero más importante en el país, aportando en ese año 810 mil toneladas de carne en canal, que representaron el 42.1% del total de la producción. En 1983 la brecha entre la producción de la carne de cerdo y la de bovino se amplía, de manera que la carne de cerdo llega a representar el 48.3% del total de carnes producidas, mientras que la de vacunos declina a un 33.5% (31).

El vertiginoso desarrollo de la porcicultura ha sido afectado por la crisis económica general que se agudiza a partir de 1982 (31). De los diversos factores que están afectando a la porcicultura en forma negativa, sin lugar a dudas, el aspecto sanitario es un factor que limita mucho la eficiencia de la industria porcina. Esto es causado por los escasos controles que se tienen en las granjas, o que no cuentan realmente con programas específicos, además de la movilización de ganado sin restricciones (16).

Las enfermedades de presentación más notoria son: Cólera Porcino, aunque desde 1983 ha disminuido notablemente; Gastroenteritis Transmisible, Aujeszky y Haemophilus. Otras que no son tan notorias por los estragos de momento, pero que sí afectan fuertemente a la economía de la industria porcina, son: Colibacilosis, Salmonelosis, Leptospirosis, Rinitis Atrófica (aunque esta última ha resultado controvertida). Y otras nuevas, dentro de las cuales ha ganado terreno el Síndrome del Ojo Azul (SOA) (16).

"SINDROME DEL OJO AZUL"

a. ANTECEDENTES.

En 1981 se comunicó por primera vez la presencia de una nueva enfermedad de los cerdos denominada "síndrome del ojo azul o cerdos zarcos" (2). Esta enfermedad aparentemente hizo su aparición en el área porcícola de La Piedad, Michoacán, México, a principios de 1980 (2, 3 y 4). El síndrome afectaba a cerdos de diferentes edades, en los que se observó: opacidad azul turquesa en uno o en ambos ojos, hepatitis y mortalidad del 1% o menos. El padecimiento inicialmente fue atribuido a la presencia de insecticidas organoclorados en el alimento, condición que al afectar el hígado, se argu-

mentó que ocasionaba una interferencia en el metabolismo de la riboflavina; lo que producía una deficiencia que se manifestaba como queratitis (2 y 3). En otro trabajo se informó de la aparición de la enfermedad, a mediados de 1980, en lechones lactantes de 4 a 10 días de edad, en donde la morbilidad fue del 20% y la mortalidad del 90%. En ese brote, que duró 9 semanas, murieron aproximadamente 600 lechones. Los animales morían entre los 2 y los 7 días después de los primeros signos, que consistían en: incoordinación, temblores musculares, postración, movimientos de carrera y opacidad de la córnea. Del brote se aisló un virus hemaglutinante (HA) (38). Posteriormente ese virus fue designado virus del síndrome del ojo azul (VSOA) (47), y fue caracterizado como un nuevo miembro de los paramixovirus (49).

En 1984, en el Laboratorio de Virología del INIP, ahora INIFAP, en Palo Alto, D.F., Martínez et al, aislaron un virus que mostró propiedades hemoaglutinantes, a partir del encéfalo de un cerdo que provenía de una granja de engorda localizada en el área de La Piedad, Michoacán (21,22, 23). En la granja afectada se había presentado un síndrome caracterizado por encefalitis, signos respiratorios, opacidad de la córnea (9) y mortalidad del 15 al 20% (21,23). El virus aislado en esa granja mostró características similares a los Paramyxovirus (9, 21 y 30); y al inocular con el espécimen original, por las vías intramuscular (IM), intravenosa (IV), subcutánea (SC), conjuntival, oral y nasal, un cerdo de -aproximadamente 4 semanas de edad, libre de anticuerpos contra la enfermedad de Aujeszky y Cólera Porcino, y de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación (IH) contra el mismo Paramyxovirus (27), se reprodujeron en él los signos clínicos de la enfermedad observada en la granja de engorda afectada. Los signos observados fueron: fiebre (40.2 C), anorexia, depresión, conjuntivitis pronunciada, signos res-

piratorios, inflamación del área periorbital y exudado nasal; a partir del noveno día se presentó ceguera parcial unilateral, con ligera opacidad de la córnea, torticolis, incoordinación, temores, desplazamiento en círculos, hundimiento de flancos, disminución de la grasa subcutánea y dificultad para levantarse (21,23). Esta fue la primera oca-primera ocasión en la que se notó, en cerdos inoculados experimentalmente, la presencia de signos respirado nasal y dado nasal y opacidad corneal; aunque esta última fue ligera. Posteriormente se inocularon 4 cerdos de 3 meses de edad y en el inoculado por vía parenteral, se observaron signos, conjuntivitis, lagrimeo, cianosis en la región ventral, ligeros signos de incoordinación, ijares un poco hundidos y lomo arqueado. Mientras que en el inoculado por vía oral, se observó conjuntivitis, lomo arqueado, diarrea y ligera respiración abdominal. Ambos cerdos mostraron respectivamente temperaturas máximas de 40.4 y 40.1 C a los 16 días postinoculación (21).

b. ETIOLOGIA.

Inicialmente, en 1981, se aisló un virus hemoaglutinante (38); posteriormente se realizaron otros aislamientos (21, 22, 23,41, 43 y 44). Mediante la inoculación de cerdos, se ha demostrado que este virus es el agente causal de la enfermedad; ya que se han logrado reproducir los mismos signos clínicos y lesiones observadas durante los brotes (21, 23,41, 43 y 44). La opacidad de la córnea no pudo ser reproducida en los primeros estudios experimentales; en dos estudios se logró producir ligera opacidad de la córnea en dos cerdos (21); y posteriormente ésta ha sido reproducida claramente en los cerdos de experimentación (13, 26, 32 y 52).

El virus aislado en 1981 fue denominado virus del Síndrome del Ojo Azul (VSDA) (47), mientras que al aislado de 1984, se le denominó Paramixovirus porcino de La Piedad, Mi-

choacán (LPM) (9, 30). Existen semejanzas entre estos virus, sin embargo, se requieren pruebas serológicas específicas que permitan relacionarlos (21 y 22).

c. CARACTERISTICAS DEL VIRUS LPM.

El aislamiento inicial de este virus LPM se realizó en células de cornete de bovino (CB) en 1984 (21). También se han usado células de riñón de cerdo (PK-15) para aislar este virus y para realizar aislamientos posteriores (21,30 y 33).

El sobrenadante del sexto pase del virus LPM en células de CB, fue dializado, centrifugado y posteriormente teñido mediante la técnica de tinción negativa, con ácido fosfotúngstico, encontrándose estructuras con morfología parecida a la de los Paramixovirus, con tamaño de aproximadamente 165 nanómetros; con proyecciones cortas en la periferia, de distribución homogénea (21). En otro estudio se corroboraron estas observaciones (30), Figura 1.

El virus LPM se replica en una amplia variedad de cultivos celulares de origen porcino, bovino, simio, células pulmonares de visón y células fatales de origen humano. En todas las células empleadas el virus LPM produjo efecto citopático (ECP) (21, 22, 23 y 30).

En células PK-15 inoculadas con 10^5 TCID₅₀ del virus LPM, por tubo, el ECP se inició a los 2 días postinoculación (PI) y fue completo a los 5 días PI. Cuando el virus LPM fue inoculado en células PK-15 de otra fuente u origen, el ECP no se observó o fue muy ligero (30). Las células PK-15 inoculadas con el virus LPM y posteriormente teñidas con hematoxilina y eosina, mostraron vacuolización del citoplasma en

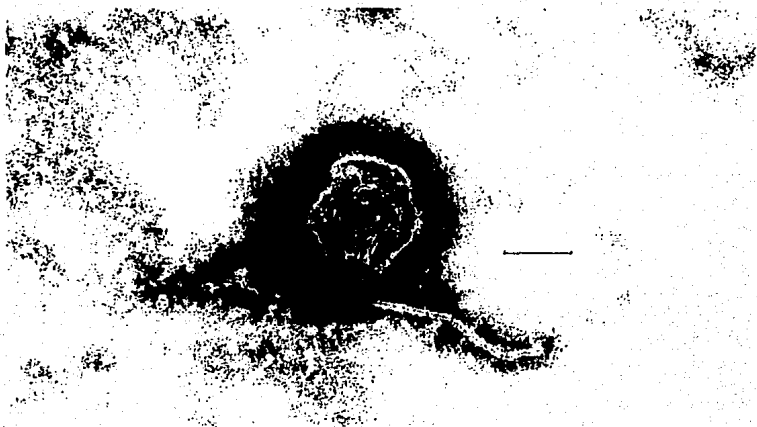


Figura 1. La foto muestra una partícula del Paramyxovirus porcino LPM parcialmente rota, fotografía obtenida en 1984, amablemente proporcionada por Atalo Martínez Lara, M.V.Z. y Pablo Correa Girón, M.V.Z., M.A., del Proyecto Paramyxovirus Porcino LPM, CENID-M, INIFAP, SARH. La barra indica 100 nm.

un plazo de 10 h, seguido por formación masiva de sincitios, que frecuentemente contenian más de 50 núcleos. Numerosos cuerpos de inclusión intracitoplásmicos rodeados por un halo fueron observados en células de mono (GMK), pero sólo se observaron algunos cuerpos de inclusión en células PK-15. Células con citoplasma acidófilo, núcleo picnótico, cariorexis y cariólisis fueron observadas a la 24 h PI (30).

En muestras del sobrenadante de células PK-15 inoculadas con el virus LPM, se encontraron títulos virales de hasta 10^7 TCID₅₀/ml, a los 3 ó 4 días PI (30).

El virus muestra actividad HA ante eritrocitos de pollo, cobayo, bovino, cerdo, caballo, conejo, oveja, cabra, rata, pavo y humano tipo O. Los títulos HA más altos se obtuvieron con eritrocitos de pollo, cobayo y pavo (i.e.: 1:128 ó 1:256). El virus también posee actividad hemoabsorbente, hemolítica y de neuraminidasa; el fenómeno de elución ocurre a los pocos minutos de incubación a 37 C (30).

El virus LPM conserva sus propiedades HA e infectivas en células PK-15 por 110 o más días de tratamiento a 37 C. A 56 C, sus propiedades HA se conservan por lo menos hasta los 30 minutos, y su infectividad hasta los 15 o más minutos. A 87 C conserva su HA durante 1 minuto y su infectividad por lo menos durante 3 minutos (10).

Las proteínas del virus LPM fueron comparadas con las del virus de Parainfluenza bovina tipo 3 (PIV-3) cepa U-23 y con las del virus de la Enfermedad de Newcastle cepa Montana, por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida. Por lo menos 4 proteínas fueron determinadas a partir del virus LPM, siendo su perfil similar al de PIV-3, pero un poco di-

ferente al del virus de Newcastle (9 y 30).

En pruebas de sueroneutralización, fijación del complemento, doble inmunodifusión e inhibición de la hemoaglutinación (IH), los sueros hiperinmunes contra los virus de Parainfluenza humana tipos 1, 2 y 3, Paperas, Sarampión, Sinicial Respiratorio y el de la Enfermedad de Newcastle no reaccionaron contra el virus LPM. El suero anti LPM no reaccionó contra el virus PIV-3 ni contra el virus de la Enfermedad de Newcastle (30).

d. DISTRIBUCION.

La enfermedad hizo su aparición en el área porcícola de La Piedad, Michoacán, en 1980 (2, 4 y 38). Durante ese año la enfermedad afectó a cerdos de granjas próximas a los estados de Guanajuato, Jalisco y Michoacán. Para diciembre de 1982, la enfermedad se difundió a cerdos de diversos centros porcícolas de estos estados (39). También a fines de 1982 se diagnosticó en el Estado de México. En 1983 en el Distrito Federal, Nuevo León, Hidalgo, Tlaxcala, Yucatán, Tabasco y Querétaro. En 1984 en Tamaulipas. Estos brotes se han diagnosticado por aislamiento viral y por serología (47).

Hasta 1984 se consideró que se habían presentado más de 500 brotes en el país (45); desafortunadamente en el trabajo en cuestión no se menciona si estos brotes fueron diagnosticados clínicamente, o si fueron comprobados mediante el diagnóstico del laboratorio.

Otros grupos de investigadores han estudiado 7 brotes de 1984 a 1987. Dos en La Piedad, Michoacán en 1984, de los cuales uno fue comprobado por aislamiento del virus (21,22 y

30); y el otro por serología retrospectiva (24). Otro en la misma área, en 1987, comprobado por serología (25). Otros 3 brotes se presentaron en el Estado de México: 1 en Toluca, en 1987, comprobado por serología (25), y 2 por el rumbo del Lago de Guadalupe, en 1987, comprobado por aislamiento (33). Y 1 brote en Jalisco, estudiado con base en los signos clínicos (17).

En un estudio serológico, se encontraron anticuerpos IH contra el virus LPM, en sueros colectados y congelados desde 1972 (35).

e. ESPECIES AFECTADAS.

Hasta la fecha parece que el cerdo es el único animal afectado en forma natural por el VSOA (14); o por el Paramyxovirus porcino LPM (30). Se menciona que el 50% de los embriones de pollo de 6 días de edad murieron en un periodo de 72 h cuando el VSOA fue inoculado en la cavidad alantoidea (47). Por otra parte, el virus LPM al ser inoculado en embriones de pollo de 5 y 11 días de edad, por vía del saco de la yema, les provocó la muerte a todos en 3 ó 4 días; pero esto no sucedió cuando se inocularon en la cavidad alantoidea ó en el saco amniótico (30).

El conejo adulto inoculado con el VSOA por vía IM, únicamente desarrolló anticuerpos (47). En otro estudio se encontró que los conejos murieron en 24 h al ser inoculados, por las vías parenteral, oral y conjuntival, con el sobrenadante de un macerado de encéfalo, procedente de cerdos de un brote de campo, que murieron presentando el síndrome. Pero no murieron al ser inoculados con el quinto pase del virus LPM, reproducido en células de CB (21). Desafortunadamente no se han concluido estos estudios, para determinar si: a) en

el tejido encefálico original existía algún contaminante; b) si el virus LPM del material original mató inicialmente a los conejos; c) o si el virus LPM perdió su patogenicidad para el conejo al ser pasado 5 veces en células de CB.

Siete perros a los que se les dió de comer carne de cerdo con SOA, permanecieron asintomáticos durante 30 días, y ninguno desarrolló anticuerpos IH contra el VSOA (14). Desafortunadamente en este estudio no se menciona que se haya comprobado la presencia de virus en la carne utilizada; los autores señalan la necesidad de repetir el estudio (14). También se inoculó un perro mestizo recién destetado de 4 semanas de edad con el primer pase en células PK-15, del macerado de una tonsila, procedente de un cerdo infectado en forma natural. Previamente se había aislado un virus similar al LPM en las mencionadas células. Se le inocularon 2 ml por vía SC, 2 ml por vía IM, 2 ml por vía oral (suspendidos en la leche), 0.1 ml en el saco conjuntival de cada ojo y 0.2 ml por instilación nasal (0.1 ml en cada fosa nasal). El perro fue observado durante 1 mes sin que se presentaran signos aparentes (33).

En otro trabajo se encontró que algunas ratas capturadas en granjas porcinas, tenían anticuerpos IH contra el virus LPM. En una granja, 4 de las 12 cerdas estudiadas fueron positivas, con títulos IH de 1:20 a 1:40, y únicamente el suero de una de las 9 ratas estudiadas fue positivo con título de 1:20. En otra granja, de 5 sueros de ratas estudiados, 3 fueron positivos con títulos de 1:20, y sólo se estudió un suero de cerda, el cual fue negativo (36).

Se desconoce si el virus LPM puede infectar o matar en forma natural a otras especies animales; desde el primer

brote descrito en 1980 en cerdos, la enfermedad no se ha informado que se presente en otras especies animales, ni en los humanos (30).

f. SIGNOS CLINICOS.

Los signos clínicos son variables dependiendo principalmente de la edad de los cerdos afectados. Los lechones de 2 a 15 días de edad son los más susceptibles y los signos clínicos se presentan súbitamente. Los primeros signos son: fiebre, eritema cutáneo, pelo erizado, lomo arqueado; acompañados principalmente de constipación, pero en ocasiones de diarrea. Posteriormente se observan signos nerviosos progresivos tales como: incoordinación, debilidad, rigidez principalmente en miembros posteriores, temblores musculares, posturas anormales (posición de perro sentado ó apoyo de trompa), marcha rígida ó a brincos. No hay anorexia, el lechón continúa mamando mientras pueda desplazarse hacia la madre. Algunos muestran hipersensibilidad, y si son levantados, hacen movimientos de pedaleo. Más tarde presentan prostración, generalmente en decúbito lateral, y finalmente están letárgicos, con algunos movimientos involuntarios, mirada perdida, pupila dilatada, ceguera y en ocasiones nistagmo. Al mismo tiempo de los signos descritos, algunos cerdos padecen conjuntivitis, ojos hinchados, lagrimeo, párpados pegados y opacidad de la córnea (OC) generalmente unilateral, pero en ocasiones bilateral. Con frecuencia sólo se observa OC, sin signos nerviosos en lechones (47 y 51). En trabajos realizados de 1983 a 1986 se menciona que el porcentaje de lechones que muestran OC puede variar desde 1 hasta 50% (Tabla 1) (17, 39, 40, 42, 44, 45, 47 y 51).

En un estudio realizado en una granja de 120 vientres, de donde se aisló el virus LPM, además de los signos mencio-

Tabla 1.- PORCENTAJES DE CERDOS CON OPACIDAD DE LA CORNEA

| E D A D | A Ñ O S | | | |
|----------------------------------|--------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------|----------------------------|
| | 1 9 8 3 | 1 9 8 4 | 1 9 8 5 | 1 9 8 6 |
| Lechones de 4-10 días | 50% (39) | | | |
| Lechones (sin especificar edad) | 20-40% (40) | 1-10% (44, 45) | 1-10% (47) | 1-10% (51) |
| Cerdos > 30 días (en desarrollo) | < 1% (39 y 40) | | 1-4% (47) 10% (47) | 1-4% (51) |
| Cerdos en engorda | < 1% (39 y 40) | 15% (17) 20% (15-40 kg) (42) | 1-20% (47) | |
| Pie de cría | Número reducido (39) Ocasional (principalmente primerizas) (40) | 1-10% (cerdas gestantes) (45) 15% (17) | Ocasional, (principalmente primerizas) (47) | Ocasional (51) |
| No se especifica la edad | | 1-4%, > 21 días (44) 1-10% de los afectados (44) | 1-10% (47) | 1-30% de los enfermos (51) |

nados anteriormente, se observó en lechones de 4 a 17 días de edad, retraso en el crecimiento, caminar en círculos y signos respiratorios (33). La muerte en los lechones ocurre entre 2 y 7 días después de los primeros signos (33, 38 y 47).

Se ha comunicado que en cerdos de engorda la enfermedad se inicia generalmente 2 ó 3 semanas después de que los cerdos son agrupados en los corrales y son sometidos a un intenso manejo (vacunaciones, baño, reagrupación, aglomeración, tratamiento individual, etc.) (24, 46 y 48) afectándose principalmente cerdos de 15 a 45 kilogramos de peso (24, 42, 46 y 48). Los signos comunicados son: apatía, tristeza, anorexia, pelo erizado, estreñimiento, fiebre, rehúsan moverse, incoordinación posterior, caminan sin rumbo ó en círculo, adoptan posiciones anormales, tienen tics, opistótomos, parálisis de miembros posteriores, muerden o golpean objetos hasta sangrar, chillan, se quejan, hay conjuntivitis, algunos presentan ojos hinchados, ceguera, opacidad de la córnea, postración, temblores musculares, convulsiones, finalmente los cerdos quedan letárgicos con los ojos abiertos y mueren (42, 46 y 48). El curso de la enfermedad es de 1 a 4 días (42 y 46). Se reporta que desde menos de 1 hasta 20% de los cerdos de engorda desarrollan OC, uni o bilateral (Tabla 1).

Debido a las características clínicas mencionadas, con signos nerviosos manifiestos, a los animales se les ha denominado "cerdos locos" (48). Los estudios realizados han demostrado que el VSDA está presente en los cerdos de engorda ("cerdos locos"); sin embargo, en estos cerdos se han recuperado otros diferentes agentes etiológicos capaces de afectar al sistema nervioso central, así como a otros que dañan a otros aparatos y sistemas (42 y 46).

En un estudio en el que se inocularon cerdos experimentalmente, además de los signos nerviosos y ligera OC en uno, se menciona la presencia de signos respiratorios (21,22,23).

El pie de cría generalmente está asintomático, incluyendo a las cerdas con camadas afectadas, aunque en ocasiones se observa opacidad de la córnea en algunas cerdas (Tabla 1). En las hembras primerizas, se ha observado anorexia, depresión, letargia, con cierta incoordinación, y 2 ó 3 días después OC, sin otro signo (39). Sin embargo, al estudiar un brote de SOA en una granja de 760 vientres, se observó que el 15% de los cerdos en engorda y reproductores, presentaron OC, predominantemente unilateral. Además se menciona que un 20% de las reproductoras que se cubrían durante las semanas posteriores al brote (no se menciona cuantas semanas), presentaron repeticiones de calores, atrasadas hasta con 45 ó 50 días después de la monta inicial; y otro 25% de las reproductoras entraban en una etapa de anestro prolongado hasta por 4 ó 5 meses; este comportamiento se fue normalizando lentamente. También se menciona que el "standard" de mortinatos en la granja era del 4% y por el brote se elevó a 32% (17). Sin embargo, en ese trabajo no se menciona que se hayan realizado otros estudios serológicos y/o virológicos, con la finalidad de confirmar el diagnóstico clínico, o de averiguar la posible existencia de otras enfermedades, productoras de estas alteraciones.

Por otro lado, en un estudio experimental, se inocularon 2 cerdas gestantes, clínicamente sanas y sin anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación (IH) contra el VSOA. Una de ellas (cerda A) de 3er. parto se inoculó a los 94-95 días de gestación, la otra cerda (cerda B), de 5to. parto se inoculó a los 34-35 días. El inóculo consistió de VSOA con título de $1 \times 10^{4.5}$ TCID₅₀ y se aplicaron 3 ml por

vía intratraqueal (IT), y 2 ml intranasalmente (IN) (suponiendo que ese volumen de inóculo haya sido para cada cerda y que el título viral se esté expresando por ml, entonces cada cerda recibió en total 158100 TCID₅₀). Una tercera (cerda C), se dejó como control. La cerda A parió 19 días después de la inoculación, 10 lechones nacidos vivos (peso promedio de 1150 gr) sin signos de la enfermedad y 2 nacidos muertos. El día del parto se detectaron anticuerpos en el calostro de esta cerda (títulos > 1:81 UIHA) y en el suero (1:270), contra el VSOA. La cerda B parió 75 días después de la inoculación, 4 lechones vivos (con peso promedio de 975 gr), 1 nacido muerto y 2 fetos momificados. Esta cerda también desarrolló títulos de anticuerpos de 1:81 y su camada no presentó signos de la enfermedad. La cerda C parió 8 lechones clínicamente sanos, y no desarrolló anticuerpos contra el VSOA (43 y 44). En el trabajo no se menciona si esta cerda permaneció en contacto o separada de las cerdas inoculadas. Tampoco se menciona si se aisló el virus del SOA de los 2 fetos momificados, ni de los 3 lechones nacidos muertos. Tampoco se realizaron pruebas con el fin de descartar por lo menos otros padecimientos de etiología viral (Aujeszky, Parvovirus porcino, Cólera porcino, etc.), que también pudieran haber sido la causa de los nacidos muertos y de los fetos momificados.

Sin embargo, una cerda de 103 días de gestación, sin anticuerpos IH vs. el Paramyxovirus porcino (Pp LPM) e inmune a Cólera porcino, al ser inoculada con el Pp LPM (10^{6.35} DFEC₅₀ /ml), por las vías conjuntival (0.4 ml), nasal (0.4 ml) y oral (2 ml), no mostró signos clínicos y parió 7 lechones; 5 nacieron clínicamente sanos y de los otros 2, uno se encontró en decúbito lateral con debilidad y tembor generalizado; y el otro se encontró muerto; ambos lechones tenían una franca OC bilateral. El día del parto

se encontraron en el suero de la cerda anticuerpos IH contra el Pp LPM (1:10), en los lechones con OC no se detectaron anticuerpos IH, y en los 5 lechones que ingirieron calostro se encontraron anticuerpos IH (1:5) (26).

g. MORBILIDAD Y MORTALIDAD.

La morbilidad y la mortalidad son variables dependiendo principalmente de la edad. La enfermedad se caracteriza por afectar a lechones de 2 a 15 días (47), con menos frecuencia se afectan cerdos destetados, en engorda o adultos (40). Los porcentajes de morbilidad y mortalidad en lechones son variables según las comunicaciones hechas de diversos brotes. Por ejemplo en brotes ocurridos en lechones, el porcentaje de camadas afectadas varía del 20 al 65% (40 y 47). La morbilidad en las camadas afectadas varía del 20 al 90% (17, 38, 40 y 47). El porcentaje de mortalidad de los que enferman va del 40 al 100% (17, 33, 38, 40 y 47), y la duración del brote, según la literatura consultada varía de 2 a 9 semanas (Tabla 2).

Se ha mencionado que en las granjas engordadoras, la mortalidad es baja (< 1%) a menos que exista asociación con otros agentes etiológicos (46 y 47) afectándose principalmente cerdos de 15-45 kg., de peso (42, 46 y 48); y que en cerdos mayores los signos neurológicos y la mortalidad son raros (46 y 48). En una granja de engorda con una población de aproximadamente 13900 cerdos, en donde se presentó un brote de SOA asociado con otras enfermedades, de 6000 cerdos con un peso de 15-40 kg., se afectaron 3000 y de estos murieron 2034; hay que observar que fue un brote de campo en donde además del VSOA, también estuvieron presentes aproximadamente otros 12 agentes etiológicos que incluían virus, bacterias y parásitos. Debido a esto es difícil eva-

Tabla 2.- ALGUNAS CARACTERISTICAS EPIZOOTIOLÓGICAS DE LOS BROTES DE SGA

| Camadas afectadas (nacidas durante el brote) (%) | Morb. en las camadas afectadas (%) | Mort. en las camadas afectadas (%) | Características del brote | Referencia |
|--------------------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------------------------------|------------|
| 20 - 65 | 20 - 50 | 87 - 99 | 2-9 sem. de duración | (47) |
| 30 | 70 - 90 | casi todos mueren | 3-9 sem. de duración | (40) |
| | 20 | 90 | 9 sem. de duración afectando lechones de 4 a 10 días de edad | (38) |
| | 56 ** | 40 ** | se afectan lechones de 4 a 17 días de edad | (33) |
| | 56 | 100 | se afectaron lechones de 4 a 10 días de edad | (17) |

* La duración del brote depende del tamaño de la piara y del número de cerdas que paren durante el brote (40 y 47).

** Los datos reportados de un brote ocurrido en una granja de 120 vientres, corresponden a los registrados de 2º brote, ocurrido 18 días después del primero, en la misma granja en donde se aisló al virus de LPM (33).

luar la importancia del VSDA en este brote (42).

En otro trabajo se menciona que en un brote, en cerdos de engorda, la mortalidad fue del 15-20%; sin embargo, no se realizaron estudios para investigar la asociación con otras enfermedades (21 y 23).

Al inocular lechones de 10 y 30 días de edad y cerdos de 90 días de edad, por vía IN e IT con $10^{4.5}$ TCID₅₀ del virus del SOA, estos no mostraron signos de la enfermedad (44). Sin embargo no se hicieron pruebas para comprobar que no tenían anticuerpos contra el VSDA antes de la inoculación.

h. CAMBIOS MACROSCOPICOS.

Las alteraciones macroscópicas observadas son: Neumonía en lóbulos craneales, atrofia serosa de la grasa coronaria, moderada distensión gástrica con acumulación de leche, acumulación de fluido con finas bandas de fibrina en la cavidad peritoneal (la cual se observa con mayor frecuencia en cerdos que han permanecido postrados) (47), congestión meníngea (26, 41 y 47), congestión en encéfalo (26 y 33), vejiga urinaria pletórica (33, 41, 47 y 52), y constipación en intestino grueso (41). Opacidad y edema de la córnea, unilateral o bilateral; aunque generalmente se observa que es unilateral (47). La OC se puede observar en cerdos de todas las edades (Tabla 1). En forma experimental se ha logrado el nacimiento de lechones con OC bilateral, pulmones neumónicos, hígado friable, petequias en mucosa estomacal, congestión en meninges y encéfalo, edema subcutáneo en la región abdominal, congestión en tonsilas, y hemorragias en miocardio y región coronaria (26). La córnea con edema llega a tener un grosor de hasta 3 mm en cerdos destetados o en engor-

da y convalecientes, su humor acuoso es escaso. En ocasiones se observa formación de una vesícula de 2 a 3 mm o úlcera en la capa externa de la córnea, así como con menor frecuencia queratocono (47). En un estudio experimental en cerdos de 27 días de edad inoculados con el VSDA, se encontró edema subcutáneo en las regiones inguinal y abdominal, Petequias en riñón, congestión en encéfalo, abundante exudado mucopurulento en tráquea y aumento del líquido cefaloraquídeo (52).

1. CAMBIOS HISTOLOGICOS.

Los cambios histológicos encontrados en cerdos infectados en forma natural y experimental con el virus LPM fueron meningoencefalitis no supurativa, con marcada infiltración linfocitaria perivascular, gliosis y necrosis. Neuronofagia, necrosis neuronal y glial, meningitis y coroiditis. Las áreas más afectadas fueron el tálamo, cerebro medio y corteza cerebral. En el pulmón se observó neumonía intersticial afectando los lóbulos apical y cardiaco (30). Cambios muy similares se han encontrado en lechones infectados con el VSDA (34, 38 y 41). Sin embargo en un estudio experimental en lechones de 1 día de edad, inoculados con el VSDA, se menciona que en el encéfalo, el daño se observó casi exclusivamente en el cerebelo, en la capa molecular, y correspondió a degeneración neuronal y axonal, necrosis neuronal y gliosis focal. También se observaron focos de infiltración por células mononucleares en meninges e inclusiones intracitoplásmicas en células de Purkinje. Estos cambios difieren en severidad de los descritos en lechones muertos en forma natural por el VSDA (32). Aún en cerdos sin signos nerviosos se observa daño microscópico en el SNC (47).

Hay tonsilitis moderada con descamación del epitelio y

células inflamatorias en las criptas (47). En un estudio experimental se encontró necrosis del tejido linfoide de las tonsilas y depresión linfoide de los ganglios (23).

En el ojo sólo se observan cambios en los cerdos que tienen opacidad de la córnea. El edema corneal es variable (47), hay uveítis anterior (48 y 51), infiltración de células mononucleares y neutrófilos en diferentes partes del ojo, endotelio corneal, unión esclerocorneal, en el ángulo iridocorneal, en el iris o en el nervio óptico. En la capa interna de la córnea se observa en ocasiones una capa de macrófagos y de neutrófilos, así como aumento de la vascularización (47). Cabe señalar que en un estudio serológico se encontró que las cerdas y los lechones con OC, mostraron tendencia a presentar títulos de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación (IH), contra el virus LPM, más elevados que los demás (25); sin embargo, también se ha comunicado la existencia de cerdos con OC en los cuales no se detectan anticuerpos IH contra el virus LPM (25, 26 y 33).

J. ANTICUERPOS EN EL CALOSTRO.

En una cerda inoculada aproximadamente a los 94-95 días de gestación por vía IN e IT con $10^{4.5}$ TCID₅₀ del VSDA, poco después del parto se detectaron altos títulos de anticuerpos en el calostro. A sus lechones se les permitió mamar calostro, y 48 h después se inocularon con $10^{4.5}$ TCID₅₀ del VSDA por diferentes vías, y no mostraron signos de la enfermedad (43 y 44). Por otro lado, en un estudio serológico realizado en una granja de ciclo completo, en donde 1 año antes se había presentado un brote de esta enfermedad, se encontró que los títulos más altos de anticuerpos IH, contra el Paramyxovirus porcino LPM, correspondieron a las cerdas en lactación y a sus lechones, mientras que en los cerdos

destetados, los anticuerpos decrecieron hasta el valor mínimo entre los 2 y 3 meses de edad y se incrementaron conforme tenían más edad. En granjas de engorda de La Piedad, Michoacán, la enfermedad se ha observado cuando los cerditos adquiridos en diferentes áreas pesan de 15-25 kg. pero antes cuando pesan de 10 a 15 kg. (a los 2-3 meses de edad), estos cerditos tienen los títulos más bajos de anticuerpos IH contra el Paramyxovirus LPM, razón por la que es probable que sea en ese periodo cuando se infectan (24).

k. TRANSMISION ENTRE GRANJAS.

Se menciona que la enfermedad se transmite a cerdos sanos por la introducción a la granja de cerdos provenientes de granjas afectadas, así como por vacunadores, Veterinarios, y otras personas, que van de granjas afectadas a granjas no afectadas (46). En 5 explotaciones donde se presentó la enfermedad no se habían introducido cerdos hasta por 3 meses antes del inicio de la enfermedad; en 3 de ellas, se había confirmado que no existían anticuerpos en los cerdos muestreados (10%). Sin embargo, tenían antecedentes de haber estado en contacto con personas o vehículos provenientes de La Piedad, Michoacán. Lo anterior sugiere la diseminación de la enfermedad por personas o vehículos contaminados (47). Por otra parte, en un estudio serológico realizado en 2 granjas cercanas, pertenecientes al mismo dueño y atendidas por el mismo Médico Veterinario, se encontró que a pesar de que en una de las granjas, 15 cerdos de 40 kg. de peso, mostraron la OC y en 13 de estos se encontraron anticuerpos IH contra el Paramyxovirus LPM (títulos 1:5 a 1:80); en la otra granja, los cerdos no mostraron OC y en 15 cerdos muestreados no se detectaron anticuerpos IH (25). El papel que juegan otros animales en la diseminación de la enfermedad se desconoce (47).

1. PERSISTENCIA DEL VIRUS.

Se desconoce por cuanto tiempo persiste el virus en un hato infectado, y por cuanto tiempo diseminan virus los animales enfermos. Cerdos sanos sin anticuerpos contra el VSOA, no enfermaron ni desarrollaron anticuerpos cuando se pusieron en contacto con cerdos convalecientes, 2 meses después de la enfermedad (47). Sin embargo en una granja de 250 vientres en donde hubo un brote de SOA, en la cual se introdujeron 54 cerdos serológicamente negativos a la enfermedad, 6 meses después del brote, si bien ninguno mostró signos de la enfermedad, en 25 cerdos se detectaron títulos ascendentes de anticuerpos IH. En el mismo trabajo se señala que, 30 cerdos libres de anticuerpos contra el VSOA se introdujeron en otra granja de 500 vientres, 11 meses después del brote, no mostraron signos, ni se detectaron anticuerpos IH en los 3 muestreos realizados, a intervalos de 21 días después de su introducción en la granja (50).

Se desconoce por cuanto tiempo resiste el virus LPM en condiciones ambientales. En condiciones experimentales el virus LPM conserva sus propiedades HA e infectivas en células PK-15 por 110 días o más de tratamiento a 37 C; a 56 C sus propiedades HA se conservan por lo menos hasta los 30 min y su infectividad hasta los 15 ó más min; a 87 C conserva su HA durante 1 min y su infectividad por lo menos durante 3 min (10).

m. DIAGNOSTICO.

Los signos clínicos clásicos de la enfermedad dan bases para el establecimiento de un diagnóstico clínico presuncional. Sin embargo, es necesario demostrar la presencia de virus o de anticuerpos específicos contra el virus. La necropsia y el estudio histológico también ayudan en el diagnósti-

co (47).

Las pruebas específicas utilizadas son:

- 1.- Aislamiento del virus. Los tejidos de elección para intentar el aislamiento son el encéfalo, tonsila (21,33 y 47) y pulmón (47). Sin embargo, también se ha aislado el virus a partir de bazo, hígado, riñón, sangre, ganglio intestinal, corazón y cornete (41).
- 2.- Inmunofluorescencia directa (47).
- 3.- Inhibición de la hemaglutinación (24 y 47).
- 4.- Seroneutralización (47).

n. PREVENCIÓN.

Como en otras enfermedades, lo más importante estriba en evitar la entrada de la enfermedad siguiendo medidas sanitarias preventivas (47). Actualmente en el Proyecto Paramyxovirus porcino LPM, del Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología (CENID-M), INIFAP-SARH, se está tratando de desarrollar una vacuna inactivada, que sea efectiva para la prevención de esta enfermedad (27).

o. CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DE LOS PARAMIXOVIRUS.

Los Paramyxovirus (Paramyxoviridae) se diferencian ampliamente en cuanto a su patogenicidad. No obstante, con base en sus propiedades químicas y algunas biológicas, los paramyxovirus son relativamente homogéneos. Por otra parte existen diferencias suficientes en sus características para permitir su clasificación en 3 géneros: Paramyxovirus, Morbillivirus y Pneumovirus (11 y 28). Todos los miembros de los géneros Morbillivirus y Pneumovirus carecen de la neuraminidasa que tienen los Paramyxovirus. La diferencia entre

Morbillivirus y Pneumovirus radica en el tamaño de la nucleocápside y otras características estructurales (28).

Acido nucleico: Contiene una molécula de ARN de cadena única, de gran tamaño (38 y 42), $PM = 5-7 \times 10^6$; más o menos el 0.5% del peso del virus. La mayor parte de las partículas contienen una cadena en sentido negativo, pero algunas contienen cadenas en sentido positivo (28).

Proteínas: 5-7 polipéptidos; PMs $35-200 \times 10^3$ (28).

La nucleocápside constituye de un 20-25% de la masa del virión; dicha cápside está formada por una sola especie de proteínas (11).

La envoltura vírica contiene 3 proteínas. 2 glicoproteínas forman las proyecciones superficiales; una (HN) tiene actividades tanto de hemaglutinina como de neuraminidasa y la otra (F) es responsable de las funciones hemolítica y de fusión celular del virión. La tercera proteína (M), que no está glucosilada, forma la capa interna de la envoltura manteniendo su estructura e integridad (11). El virión de algunos miembros de este grupo puede contener también enzimas como la ARN-polimerasa, dependiente del ARN (18), Figura 2.

Lípidos: 20-25% del peso; su composición es dependiente principalmente de la célula hospedadora (28).

Carbohidratos: 6% del peso; composición dependiente de la célula hospedadora (28).

Propiedades fisicoquímicas: PM del virión por lo menos 500×10^6 , mucho más para viriones pleomórficos multiploides; densidad en sacarosa = $1.18-1.20 \text{ g/cm}^3$; sensibles a disolventes de los lípidos, detergentes no iónicos, formaldehído

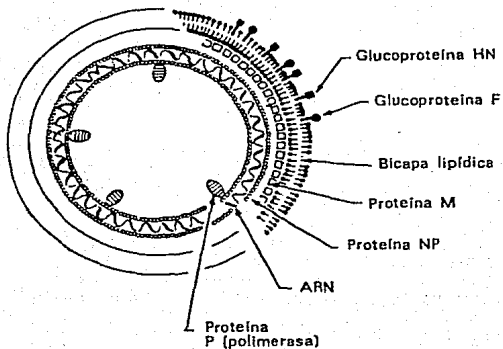


Figura 2. Diagrama de un paramixovirus. (Se muestran formas diferentes para las glucoproteínas F y HN para indicar sus diferencias químicas, aunque no son distinguibles en las microfotografías electrónicas). Las glucoproteínas F y HN parecen penetrar en la bicapa lipídica y pueden atravesar toda la envuelta. La proteína M forma la capa interna de la envuelta y mantiene su estructura e integridad. Se desconoce la disposición efectiva de la proteína NP en la nucleocápsida (11).

y agentes oxidantes (28).

Morfología: la forma de los viriones es pleomórfica, pero en general es aproximadamente esférica; mide 150 nm o más de diámetro (28 y 29). La partícula vírica intacta posee una envoltura externa bien definida, de un grosor aproximado de unos 10 nm (11), derivada de la membrana plasmática de la célula incorporando glicoproteínas virales y proteínas virales no glicosiladas (28). Las proyecciones de superficie (peplómeros) de 8 nm de longitud se encuentran de 8 a 10 nm espaciados entre sí (28 y 29). La nucleocápside tiene simetría helicoidal; diámetro de 12-17 nm dependiendo del género; y longitud de 1 μ m en algunos géneros (28).

Propiedades antigénicas: hay uno o más antígenos de superficie involucrados en la neutralización; un antígeno de nucleocápside descrito; las especificidades de los antígenos varían entre los géneros (28).

Efecto en las células: generalmente citolítico, pero son comunes las infecciones moderadas y persistentes; además forman inclusiones, sincitios y producen hemoadsorción (28).

Otras características: los viriones son relativamente inestables, ya que pierden el 90-99% de su infectividad en 2-4 h, cuando son suspendidos en un medio libre de proteínas a la temperatura ambiente, ó a 4 C (11).

p. MULTIPLICACION DE LOS VIRUS.

Los virus sólo se multiplican en células vivientes (18). A diferencia de lo que ocurre con las células, el tamaño de los virus no aumenta, ni su división es de tipo celular, ya que poseen en su cubierta pocas o ningunas de las enzimas biosintéticas necesarias para su replicación. Por esta razón, los virus se multiplican por síntesis y luego por reunión de sus componentes (11). La célula huésped debe-

rá proporcionar la energía y maquinaria de síntesis, también los precursores de bajo peso molecular para la síntesis de las proteínas virales y de los ácidos nucleicos. El ácido nucleico viral transporta la especificidad genética para cifrar todas las macromoléculas específicas virales en una forma altamente organizada (18).

q. FASES DE LA MULTIPLICACION.

Los ciclos de multiplicación parecen ser idénticos para todos los Paramixovirus, excepto por la variación que se produce en la duración de las distintas fases. Así, por ejemplo, el periodo de eclipse es de 3 a 5 h en el caso del virus de la Parainfluenza, de 16 a 18 h para el virus de la Parotiditis y de 9 a 12 h para el virus del Sarampión. Los fenómenos biosintéticos básicos (estudiados principalmente en el virus de la Parainfluenza de tipo 1 y en el virus de la Enfermedad de Newcastle) son parecidos a los que se producen en otros virus que contienen ARN de cadena única, y que poseen en sus viriones una ARN-polimerasa dependiente de ARN (11).

A continuación se describe el mecanismo de multiplicación de estos virus, haciendo especial referencia a los Paramixovirus.

1.- Fijación o adsorción. Los virus y las células tienen receptores, y una afinidad entre ellos induce su fijación. La falta de receptores es la causa de la resistencia de algunas células a la infección por ciertos virus (29). La presencia o ausencia de receptores para ciertos virus depende de la especie y del tejido del que la célula procede y de su estado fisiológico. Los virus encapsulados, como los Ortomixovirus y los Paramyxovirus, se adhieren a través de agujas glicoproteicas (11).

2.- Penetración. La penetración de un virus en el interior de una célula depende de la temperatura, y es más eficaz a 37 C (29). Las microfotografías electrónicas muestran que en la mayoría de los virus encapsulados la penetración se produce cuando la cubierta viriónica se fusiona con la membrana celular, estos virus pueden penetrar también en las células por fagocitosis (11).

3.- Escape o salida. Se clasifica con este término la liberación del ácido nucleico infeccioso desde la capa o cubierta viral, e igual que la penetración, también depende de la temperatura, siendo más eficaz a 37 C. Después de la adsorción, la cápside y la envoltura se hallan muy alteradas, y este cambio termina en disolución a su entrada en citoplasma. La proteína de la cápside no es digerida por enzimas, excepto en el caso de los reovirus (29). El mecanismo de degradación de la cápside varía entre los diferentes virus (11).

Eclipse.- El eclipse se pone de manifiesto mediante la imposibilidad de recuperar viriones infectantes a partir de las células destruidas (aunque sí pueden recuperarse ácidos nucleicos infectantes). En el caso de los virus encapsulados, el eclipse es el resultado de la pérdida de la cubierta en el momento de la penetración (11). La fase de eclipse incluye transcripción, traducción, replicación o reproducción del ácido nucleico viral, reunión y maduración de los viriones. El periodo latente es el tiempo entre la desaparición del virión infeccioso de la célula y la liberación de nuevos viriones en líquido sobrenadante (29).

Transcripción.- Los Paramixovirus tienen una molécula de ARN de cadena única que no puede servir de mensajero y que posee una polaridad opuesta (antimensajero). En este filamento vírico negativo, una transcriptasa viriónica inicia la transcripción en un promotor simple para producir varias (de

5 a 8) moléculas (de cadena positiva) mensajeras complementarias (12). El ARN no segmentado del virión tiene tan sólo un sitio promotor para la ARN-polimerasa y, por tanto, los ARNm monocistrónicos se obtienen probablemente ya sea por fragmentación de una copia de todo el genoma o bien por copia secuencial, terminación y reiniciación precisa. Lo que da lugar a una serie de ARNm de longitudes variables hasta el tamaño del ARN del virión. La fragmentación y elaboración de una gran copia parece más probable (11).

Traducción.- La traducción de ARNm en virus que contienen ARN, como los virus ADN, tiene lugar en el citoplasma hacia los ribosomas. Los ARNm monocistrónicos son traducidos en polipéptidos separados (29). En los Paramixovirus no está claro si la regulación de la producción de proteínas víricas, se efectúa en la transcripción o por modificación de las copias primarias (12).

Replicación del ARN.- La reproducción o réplica del ARN viral ocurre en el citoplasma de la célula (11 y 29). El ARN viral actúa como plantilla para la síntesis de la descendencia del ARN viral por las enzimas replicasas. Las cuales están codificadas para virus, y tienden a ser específicas para el ARN de su propia especie viral (29). Existe un intermediario replicante (IR) que contiene una cadena positiva completa y varias cadenas de crecimiento complementario (negativas). Las cadenas mensajeras o viriónicas (positivas) son duplicadas en modelos complementarios (negativos) a través de un intermediario similar (11 y 12).

Maduración.- Las proteínas víricas tienen que estar primero asociadas con el ácido nucleico para formar la nucleocápside, que después es rodeada por la envoltura. En la formación de la nucleocápside todas las proteínas son sintetizadas en los polisomas citoplásmicos y se ensamblan rápidamente en componentes de cápside (reconocibles por inmunofluorescencia

o microscopía electrónica). En los Paramixovirus estos componentes se acumulan en una zona perinuclear del citoplasma, iniciándose a las 3 h después de la infección (12). Sólo una pequeña proporción de las nucleocápsides formadas llegan a ensamblarse para formar viriones. En ocasiones, las cadenas positivas, a causa de su exceso, pueden reunirse accidentalmente en viriones, así como en nucleocápsides. Los cuerpos de inclusión citoplásmicos son predominantemente acumulaciones de nucleocápsides excesivas (11).

Los estudios al microscopio electrónico de células infectadas permiten detectar el interesante proceso de ensamblaje y maduración de los Paramixovirus a nivel de la membrana plasmática (11). En el ensamble de la envoltura, las proteínas de la envoltura especificadas por el virus (glicoproteínas) van directamente a la membrana celular apropiada, sustituyendo las proteínas del hospedador. Por el contrario, los lípidos son muy similares a los de las membranas celulares en cuanto a composición. Por lo tanto, el mismo virus diferirá en sus lípidos e hidratos de carbono cuando es replicado en células diferentes, con las consiguientes diferencias en las propiedades físicas, biológicas y antigénicas (12).

Cuando la envoltura vírica contiene una proteína de matriz (como ocurre en los Paramixovirus), se hace en los polisomas y se pega al lado citoplásmico de la membrana plasmática, probablemente a las terminaciones sobresalientes de las glicoproteínas víricas, estas membranas celulares diferenciadas están destinadas a ser las envolturas víricas. La infectividad del virus, así como las propiedades hemolíticas y de fusión celular, requieren de la maduración de la glicoproteína F por la rotura de un precursor mayor F₀, por una enzima celular (11).

Liberación de viriones.- En los Paramixovirus, la liberación de las partículas víricas se produce por gemación, en las regiones de la membrana celular modificadas por las proteínas virales. Este brote (gemación) puede ser considerado el resultado de una adhesión íntima de la nucleocápside a la proteína matriz (M) presente en el lado citoplásmico de la membrana celular, donde fueron incluidas las glicoproteínas víricas. La adhesión provoca que la membrana se curve dando lugar a la formación de una esfera sobresaliente que queda rodeando a la nucleocápside (12). El ensamblaje final de la nucleocápside y la membrana plasmática alterada específicamente, es particularmente destacado en los Paramixovirus (11).

r. EFECTO CITOPÁTICO.

En las células infectadas, susceptibles al virus en estudio, ocurren algunos cambios bioquímicos, que en muchos casos, producen efecto citopático (ECP) y la muerte de las células. De los diversos tipos de este efecto son característicos la contracción, lisis, acumulación de las células en grupos y formación de sincitios (29).

El ECP se debe a un bloqueo de ADN, ARN celular y de la síntesis de proteínas, a la que sigue la síntesis de proteínas codificadas para el virus. La proteína viral o los viriones se acumulan a veces en grandes agregados o inclusiones cristalinas que deforman visiblemente las células. Una concentración elevada de virus o de proteína de cápside viral, ejerce efecto tóxico sobre la célula y produce efecto citopático, y algunos virus causan tal efecto por alteración de los microtúbulos celulares. Cabe también consignar que la alteración de las membranas lisosómicas puede activar y liberar enzimas lisosómicas hidrolíticas que a veces causan

ECP. Ocurre fusión celular o formación de sincitio (célula gigante multinucleada, policariocito), cuando el virus recién sintetizado por gemación, en una célula, se fusiona con la membrana plasmática de una célula vecina, o en la fusión de áreas específicas de virus de 2 células adyacentes (29).

s. HEMAGLUTINACION.

Muchos virus, tanto pequeños como grandes, pueden aglutinar glóbulos rojos. Esta importante propiedad, descubierta independientemente para el virus de la gripe por Hirst, y por McClelland y Hare, en 1941 (11), proporciona un método simple y rápido para la titulación vírica. En general, la hemaglutinación es causada por los propios viriones; en algunos casos, sin embargo, como ocurre con los Poxvirus, es causada por hemaglutininas producidas durante la multiplicación vírica. Los productos de desintegración de los viriones pueden causar también hemaglutinación (11).

Aunque el espectro de especies de eritrocitos que son aglutinados y las condiciones requeridas varían para diferentes virus, el fenómeno es básicamente similar en todos los casos, y es causado por la unión de sitios específicos de los viriones con receptores de la membrana de los eritrocitos. Los receptores son residuos de ácido N-acetilneuramínico (NANA) transportados sobre la glucoproteína principal de la superficie del eritrocito, la glucoforina. De hecho, los receptores son inactivados por la neuraminidasa, que desdobla el NANA. En los Paramixovirus, una sola clase de proyecciones glicoproteicas localizadas en la superficie externa de los viriones (glicoproteína HN), posee actividad hemaglutinante y de neuraminidasa. A 37 C, la neuraminidasa vírica disocia finalmente los virus de los eritrocitos por desdoblamiento del NANA procedente de los re-

ceptores; después el virus se escapa espontáneamente de los eritrocitos, que se disgregan. Por el contrario, a cero C, la enzima es mucho menos activa y la unión virión-eritrocito es estable (11).

Una vez separado el virus, las células no pueden ser nuevamente aglutinadas por un nuevo lote de virus, puesto que han perdido los receptores; se dice que estas células están estabilizadas. El virus eluido por levigación retiene, por el contrario, todas sus actividades. No obstante, las células estabilizadas por un Ortomixovirus o Paramixovirus determinado, pueden ser a veces aglutinadas por otro virus de estas familias (11).

t. CELULAS PK-15

La línea padre de PK-15, el original PK-2, fue originada del riñón de un cerdo adulto, en 1953 por E. Stice, de Laboratorios Cutter. La línea fue inicialmente mantenida en medio 199 de Morgan, Morton y Parker's al 50%; Hank's o Earle's BSS, 40-45%; suero de cordero, 5-10%; y antibióticos. La clona de PK-15 fue originada a través de clonación de una sola célula, en 1957 por Morgan Harris. Una vez clonada, el pasaje 114 fue caracterizado. La línea es ahora cultivada en MEM (Eagle) con aminoácidos no esenciales y piruvato de sodio en Earle's BSS, con bicarbonato reducido (0.85 g/litro), 95%; suero de ternera recién nacida, 5%; sin antibióticos. Células del pasaje clonal 129 fueron remitidas a ATCC. La línea celular PK-15 replica, Cólera Porcino, Fiebre Aftosa, Exantema Vesicular del Cerdo, Peste Porcina Africana previamente pasado en leucocitos porcinos (no publicado) (*).

* Hay, R.; Macy, M.; Chen, T. R.; McClintock, P. and Reid, . 1988. American Type Culture Collection Catalogue of Cell Lines and Hybridomas, 6th. ed., ATCC, Maryland, U.S.A. p. 20.

OBJETIVOS

- 1.- CONOCER EL CICLO DE MULTIPLICACION DEL Paramyxovirus PORCINO LPM EN LA LINEA CELULAR PK-15.
- 2.- CONOCER LA SECUENCIA DE CAMBIOS CELULARES EN CELULAS PK-15 INFECTADAS CON EL Paramyxovirus PORCINO LPM.
- 3.- RELACIONAR LOS TITULOS VIRALES HEMAGLUTINANTES (HA) CON LOS TITULOS VIRALES OBTENIDOS CON BASE EN EL EFECTO CITOPATICO (ECP).
- 4.- RELACIONAR EL GRADO O % DE ECP OBSERVADO CON EL TITULO VIRAL.

MATERIAL Y METODOS.

VIRUS.

Se utilizó el Paramyxovirus porcino LPM (9, 21 y 30) al cual se le habían dado nueve pases en cultivos celulares; los primeros siete pases se dieron en células de CB, y los dos últimos en una línea celular establecida de riñón de cerdo (PK-15). El virus utilizado tuvo un título inicial por hemaglutinación (HA) de 1:32/0.05 ml, ante eritrocitos de gallo y utilizando solución salina con un pH de 6.2. Su título, basado en el ECP, era de $10^{5.47}$. Dosis Formadoras de Efecto Citopático (DFEC) 50 /ml, en células PK-15.

CULTIVOS CELULARES.

Se utilizaron monoestratos de células PK-15, pase No. 192, de 2 días de edad y 90-100% de confluencia; en esta línea celular, el virus se había replicado con anterioridad (21 y 23).

Se realizaron tres experimentos: Experimento A.- Las células se propagaron en 33 tubos de Leighton (TL) sin laminillas; Experimento B.- En este caso se prepararon monoestratos en 32 TL con laminillas; y el Experimento C.- En el que se prepararon monoestratos en 20 botellas de dilución de leche (DL).

INFECCION DE LOS CULTIVOS CELULARES.

Los monoestratos fueron infectados en forma simultánea cuando contenían alrededor de 328 000, 315 000 y 3 700 000 células, respectivamente, en los monoestratos de los TL sin laminilla, TL con laminilla y en las botellas DL. Aplicando las siguientes dosis de virus: A) Los TL sin laminilla recibieron 0.1 ml cada uno del virus diluido 1:10 ($10^{3.47}$ DFEC) dejando 3 monoestratos celulares en TL como contro-

les; B) Los TL con laminilla se inocularon con 0.1 ml cada uno del virus sin diluir ($10^{4.47}$ DFEC⁵⁰), dejando 3 monoestratos celulares en TL como controles y; C) Las botellas de DL recibieron 3 ml cada una, del virus original diluido 1:10 ($10^{4.94}$ DFEC⁵⁰), dejando 2 monoestratos celulares en botellas de DL como ⁵⁰ como controles.

Para inocular los monoestratos celulares, se retiró el medio de crecimiento [Minimum Essential Medium (MEM)] (1) el cual contenía 10% de suero fetal de ternera irradiado y ultrafiltrado (6, 7 y 8). Luego se agregó el inóculo y se permitió la adsorción, moviendo los monoestratos cada 10 min durante 1 h, a 37 C, después se deshechó el inóculo y se agregó medio de mantenimiento, consistente en MEM más 2% de suero fetal de ternera, irradiado y ultrafiltrado. A los TL con y sin laminilla, se les puso 1 ml, y a las botellas de DL, 20 ml, de este mismo medio. En seguida los monoestratos se incubaron a 37 C, durante 9.75 días en el Experimento A; 10.25 días en el Experimento B; y 12.2 en el Experimento C. Se usaron TL y botellas DL para ahorrar MEM y alargar el período de obs. El No. de TL y de botellas DL dependió del material disponible en el Lab. Las observaciones se hicieron cada 8, 12 y 24 h para alargar el período de obs.; esto causó los dif. tiempos (9.75, 10.25 y 12.2 días PI).

TECNICA DE CONTEO CELULAR (2).

El conteo de células se hizo, en el momento de infectar los monoestratos, a partir de cada uno de los monoestratos controles, contenidos en 1 TL sin laminilla, 1 TL con laminilla y en 1 botella de DL.

(1) MEM de GIBCO, Cat. 410-1500 EB, EUA.

(2) Técnica no publicada, utilizada en el Baker Institute for Animal Health, Cornell University, Ithaca, New York, E.U.A.

I. TRIPSINIZACION Y SUSPENSION DE LAS CELULAS.

Procedimiento empleado para los monoestratos preparados en los TL:

- 1.- Se retiró el medio de crecimiento.
- 2.- Se lavó el monoestrato con 0.2 ml de tripsina (3) (ver Apéndice 1).
- 3.- Se agregaron 0.2 ml de tripsina, y esto se incubó durante 10 min a 37 C.
- 4.- Se añadieron 1.3 ml de medio de crecimiento sin suero, de esta manera, las células quedaron suspendidas en un volumen total de 1.5 ml.
- 5.- Se pipeteó varias veces la suspensión de células para lograr que se separaran.

Procedimiento utilizado para la botella de DL:

- 1.- Se retiró el medio de crecimiento.
- 2.- Se lavó el monoestrato con 3 ml de tripsina.
- 3.- Se cubrió el monoestrato con 3.5 ml de tripsina, y se incubó durante 10 min a 37 C.
- 4.- Se pipeteó varias veces.
- 5.- Se agregaron 16.5 ml de MEM sin suero, de esta forma las células quedaron suspendidas en 20 ml.

II. CONTEO DE LAS CELULAS:

El conteo de células de las suspensiones obtenidas de los 2 TL y de la botella de DL, se realizó, en cada caso, de la siguiente forma:

- 1.- Se homogeneizó la suspensión celular.
- 2.- Con una pipeta Pasteur, se tomó una muestra de la suspensión celular.
- 3.- Utilizando una cámara de recuento de Neubauer, previa-

(3) TRYPSIN 1:250, DIFCO, Cat. No. 0152-15, EUA.

mente preparada con un cubreobjetos, se tocaron con la punta de la pipeta Pasteur que contenía la muestra de suspensión celular, ambos cuadrantes de la cámara, en el espacio entre el cubreobjetos y la plataforma de la cámara. Se retiró la pipeta en el momento en que la muestra alcanzó el borde de la plataforma y la muestra por sí sola se desplazó debajo del cubreobjetos por capilaridad.

4.- Posteriormente se colocó la cámara en el microscopio y se cuantificaron las 8 áreas donde normalmente se realiza el conteo para glóbulos blancos (5).

5.- El resultado de la lectura se dividió entre 8 y después se multiplicó por 500. El resultado así obtenido indicó el número de células que había por cada 0.05 ml.

CICLO DE MULTIPLICACION.

Experimento A.- Los TL sin laminillas fueron observados cada 8 h; en cada ocasión se observaron en el microscopio invertido, un TL inoculado y un TL control; después de registrar el grado de ECP, el TL inoculado se congeló a -70°C . Los TL controles fueron observados y congelados a -70°C . Únicamente a los 7.4, 8 y 8.75 días postinoculación (PI), el período de observación en este experimento fue de 9.75 días PI (234 h) (Cuadro 1).

Experimento B.- Cada 12 h, durante los primeros 5 días, y cada 24 h durante los 5 días siguientes, se observaron 2 TL inoculados, en las dos últimas observaciones sólo se usó un TL; en cada observación siempre se compararon los TL inoculados con un TL control. En seguida se extrajo (por separado) el sobrenadante de cada tubo inoculado y se congeló a -70°C ; también se extrajeron sus laminillas para fijarlas y posteriormente teñirlas. Las laminillas de los TL controles se colectaron y fijaron a los 3.75, 6.25 y 10.25 días PI; al mismo tiempo se congelaron sus líquidos sobrenadantes, cada

uno por separado (Cuadro 2).

Experimento C. Cada 12 h durante los primeros 5 días y cada 24 h en los siguientes 7 días, se observó una botella de DL inoculada y una botella de DL control. Después de cada observación, se congeló a -70°C la botella de DL inoculada. Una de las botellas de DL controles se congeló a los 5.2 días y la otra a los 12.2 días PI (Cuadro 3).

Los monoestratos y sobrenadantes de las botellas de DL y los sobrenadantes de los TL con laminilla se congelaron y descongelaron 3 veces, a -70°C y a temperatura ambiente (aprox. 20°C) respectivamente; y los monoestratos y sobrenadantes de los TL sin laminilla 4 veces; y en forma semejante los controles. Para separar los restos celulares, las suspensiones descongeladas fueron centrifugadas a $600 \times g$ durante 15 min, a 4°C ; luego se cosecharon los sobrenadantes y se repartieron en alícuotas, que de nuevo fueron congeladas a -70°C , hasta su titulación.

TITULACION VIRAL.

Las alícuotas de todas las suspensiones, incluyendo las controles, fueron descongeladas e inmediatamente tituladas por la técnica de HA (19 y 24) y también con base en el ECP (37) por el sistema de microtitulación. A continuación se describen ambas técnicas.

TITULACION POR HEMAGLUTINACION.

Para esta técnica se utilizaron microplacas de plástico de 96 pocitos, con fondo en forma de "U" (4), solu-

(4) Nunc, Cat. No. 262170, Dinamarca.

ción salina (SS) (0.85%, pH 6.2) y eritrocitos de gallo diluidos al 0.5% en SS.

1.- Con una micropipeta (5) de punta de acero calibrada a 0.05 ml por gota, se agregaron 0.05 ml de SS en cada uno de los 96 pocitos.

2.- Después se introdujeron los microdilutores (6), de punta calibrada para retener 0.05 ml, en la muestra de virus y se pusieron en los pocitos de la primera fila de 12 pozos (fila A); y se giraron dentro del pocito aproximadamente 15 veces. Por cada muestra se emplearon 4 pocitos para cada dilución.

3.- Se pasaron los microdilutores a la siguiente fila (B) y se realizó la misma operación hasta la fila G, (el esquema de diluciones dobles fue de 1:2 a 1:128).

4.- La última fila (H) se dejó como control de eritrocitos.

5.- Para ello se agregaron 0.05 ml de la suspensión de eritrocitos al 0.5% en todos los pocitos; los cuales, como ya se mencionó, ya tenían 0.05 ml de SS.

6.- Se agitó suavemente la placa.

7.- Se incubó a temperatura ambiente, de aproximadamente 20 C, durante cuando menos 30 min, o el tiempo necesario para que en la fila H, los eritrocitos se sedimentaran y formaran un botón circular perfectamente delimitado. Por lo que en ocasiones se incubó durante 60 min.

8.- Se realizó la lectura: la hemaglutinación positiva estuvo indicada por una red o capa delgada y difusa de eritrocitos, que cubría todo el fondo de los pocitos, y les daba una coloración rojo salmón. La falta de hemaglutinación (HA negativa) fue indicada por la formación de un botón compacto, finamente delimitado, en el fondo de los pocitos.

(5) Dynatech Laboratories Inc. Cat. No. 1-220-17, EUA.

(6) Cooke Engineering Co. Cat. No. B-1184-5, EUA.

El título HA obtenido fue expresado por cada 0.05 ml de virus utilizado.

TITULACION CON BASE EN EL EFECTO CITOPATICO (ECP).

Para esta prueba se usaron microplacas de plástico de 96 pocitos, de fondo plano, con tapa (7).

1.- Con cada muestra del virus LPM, se hicieron diluciones logarítmicas (10^{-1} a 10^{-7}), usando MEM sin suero, como diluyente.

2.- Con la micropipeta de punta de acero calibrada a 0.025 ml (8), se agregaron 0.025 ml de MEM adicionado de 10% de suero fetal de ternera irradiado y ultrafiltrado, en todos los pocitos de la placa.

3.- Con una micropipeta automática de puntas intercambiables (9), se agregaron 0.025 ml, de cada dilución del virus, en cada uno de los 8 pocitos (utilizando una columna de 8 pocitos por dilución); se usó una punta diferente para depositar cada dilución. En la primera columna de 8 pocitos se agregó la suspensión viral original, sin diluir, y las 7 columnas restantes se usaron para las diluciones del virus (de 10^{-1} a 10^{-7}).

4.- Con la micropipeta de 0.05 ml se agregaron 0.15 ml de una suspensión de células PK-15, en todos los pocitos en los que se agregó virus.

Por cada prueba realizada, se utilizaron 16 pozos en los que en cada uno se agregaron 0.15 ml de suspensión de células y 0.05 ml de MEM más 10% de suero, estos pozos sirvieron como controles de células.

(7) Nunc, Cat. No. 1-6700B, Dinamarca.

(8) Cooke Engineering Co. Cat. No. B 1186-1, EUA.

(9) Eppendorf Digital Pipette, 4710, 10-100 microlitros, Cat. No. 022-33-355-1, Canadá.

La suspensión de células se preparó de la siguiente manera: dos monoestratos de células PK-15, de 2 días de edad, contenidas en 2 botellas de dilución de leche, con una confluencia de aproximadamente 90-100%, se desprendieron con tripsina (al 0.05%, a 37 C), se centrifugaron en refrigeración a 1000 r.p.m., y el paquete celular se recuperó en 90-100 ml de MEM adicionado de 10% de suero fetal de ternera, irradiado y ultrafiltrado. A partir de la suspensión celular se separó una muestra para realizar el conteo celular, usando la técnica descrita anteriormente, y se encontró que el número de células contenido en 0.15 ml varió de 21 455 a 28 200 células.

5.- Se cubrió la placa con una gasa estéril y con su tapa de plástico.

6.- Se incubaron las placas a 37 C en una estufa de CO₂ durante 6 ó 7 días y entonces se procedió a realizar la lectura en el microscopio invertido, observando el ECP característico del virus LPM.

7.- Interpretación: Con los datos obtenidos, mediante el método de Karber (37) se calculó el título viral, expresado en Dosis Formadoras de Efecto Citopático (DFEC) por cada 0.025 ml.

OBSERVACIONES CITOLÓGICAS.

Durante los primeros 5 días, los monoestratos de las laminillas del Experimento B, fueron observados, y sus laminillas fijadas cada 12 h, y en los siguientes 5 días PI cada 24 h. Las laminillas de los TL controles, se colectaron y fijaron a los 3.75, 6.25 y 10.25 días PI. Después de extraer el medio sobrenadante, las laminillas fueron fijadas en solución de Clarke (20), y posteriormente se tñeron con hematoxilina y eosina. La solución de Clarke contenía 75% de alcohol absoluto y 25% de ácido acético glacial. Las laminillas se fijaron en la solución de Clarke, en la siguiente

forma:

- 1.- Se sumergió la laminilla en la solución de Clarke durante 10-20 min.
- 2.- Se lavó la laminilla en alcohol al 70% durante 5 minutos.
- 3.- Se mantuvieron las laminillas en alcohol al 80% hasta que se tiñeron.

RESULTADOS.

CURVA DE MULTIPLICACION DEL PARAMYXIVIRUS PORCINO LPM.

Experimento A.- Con base en el título del virus original ($10^{5.47}$ DFEC /ml) y el número de células utilizadas (328 000), la multiplicidad de infección (MI) utilizada, o sea la relación entre el número de viriones y el número de células (11) fue de aproximadamente 0.009 DFEC por célula. Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 1, en donde se observa que con esta MI, en el TL cosechado a los 1.75 días PI se empezaron a notar indicios de ECP. Este fue aumentando gradualmente, de modo que a los 3.7 días PI ya era de un 50% y de los 7.4 días en adelante del 100%.

La actividad HA se detectó a partir de las 34 h PI con un título de 1:4/0.05 ml; cuando aún no se observaba ECP. El título HA subió gradualmente hasta alcanzar un máximo de 1:64 a los 4.4 días cuando se observó un 85% de ECP. Entre los 4.75 y 7.75 días, los títulos oscilaron entre 1:16 y 1:64, con excepción de dos tubos que tuvieron títulos de 1:8 (a los 6.08 y 7.75 días). Entre los 8.08 y 9.75 días, los títulos oscilaron entre 1:32 y 1:64. Estos datos se muestran en la Gráfica 1, en donde se observa que hacia el final del experimento los títulos HA fueron más altos que los obtenidos al inicio; esto a pesar de las variaciones observadas.

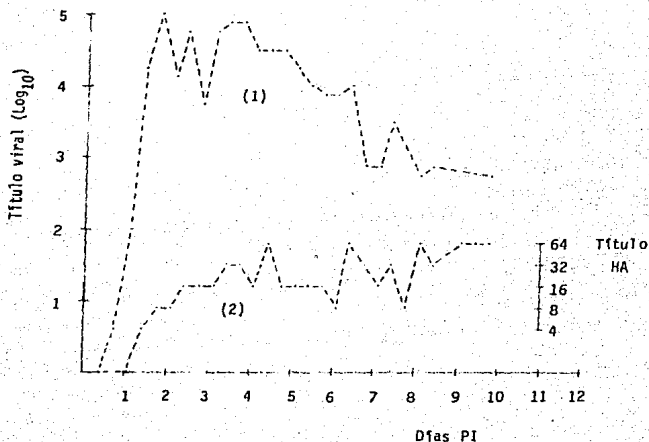
El título con base en el ECP, determinado en células PK-15, se detectó a partir de las células y el sobrenadante cosechado a las 18 h PI y fue de $10^{0.62}$ DFEC /0.025 ml (Cuadro y Gráfica 1). No obstante que cuando fueron observadas (antes de la congelación) no mostraban ECP. Posteriormente, a las 26 h, el título viral aumentó a $10^{2.0}$. Más tarde, a los 1.4 días (34 h), se elevó a $10^{4.25}$, para que a los 1.75 días se alcanzara un título máximo de $10^{5.0}$. En las siguientes observaciones, de los 2.08 a los 3.75 días, el título

Cuadro 1.- Experimento A: Titulo HA (a) y por ECP (b) del virus PI inoculado en células PK-15, preparadas en tubos de Leighton sin laminilla, cosechando el líquido sobrenadante y las células, a diferentes periodos.

| Tubo No. | Horas PI (c) | Días PI | ECP (%) | Titulo HA/0.05 ml | Titulo ECP Log /0.025 ml |
|-----------|--------------|---------|----------|-------------------|--------------------------|
| 1 | 10 | 0.4 | 0 | (-) | (-) |
| 2 | 18 | 0.75 | 0 | (-) | 0.62 |
| 3 | 26 | 1.08 | 0 | (-) | 2.0 |
| 4 | 34 | 1.4 | 0 | 4 (d) | 4.25 |
| 5 | 42 | 1.75 | Indicios | 8 | 5.0 |
| 6 | 50 | 2.08 | 3 | 8 | 4.12 |
| 7 | 58 | 2.4 | 5 | 16 | 4.75 |
| 8 | 66 | 2.75 | 10 | 16 | 3.75 |
| 9 | 74 | 3.08 | 15 | 16 | 4.75 |
| 10 | 82 | 3.4 | 20 | 32 | 4.87 |
| 11 | 90 | 3.75 | 50 | 32 | 4.87 |
| 12 | 98 | 4.08 | 75 | 16 | 4.5 |
| 13 | 106 | 4.4 | 85 | 64 | 4.5 |
| 14 | 114 | 4.75 | 85 | 16 | 4.5 |
| 15 | 122 | 5.08 | 90 | 16 | 4.25 |
| 16 | 130 | 5.4 | 95 | 16 | 4.0 |
| 17 | 138 | 5.75 | 70 | 16 | 3.87 |
| 18 | 146 | 6.08 | 95 | 8 | 3.87 |
| 19 | 154 | 6.4 | 95 | 64 | 4.0 |
| 20 | 162 | 6.75 | 90 | 32 | 2.87 |
| 21 | 170 | 7.08 | 95 | 16 | 2.87 |
| 22 | 178 | 7.4 | 100 | 32 | 3.5 |
| 23 | 186 | 7.75 | 100 | 8 | 1.0 |
| 24 | 194 | 8.08 | 100 | 64 | 2.75 |
| 25 | 202 | 8.4 | 100 | 32 | 2.87 |
| 26 | * | * | * | * | * |
| 27 | 218 | 9.08 | 100 | 64 | ** |
| 28 | 226 | 9.4 | 100 | 64 | ** |
| 29 A | 234 | 9.75 | 100 | 64 | 2.75 |
| 29 B | 234 | 9.75 | 100 | 32 | 2.62 |
| Control 1 | 178 | 7.4 | 0 | (-) | (-) |
| Control 2 | 194 | 8.08 | 0 | (-) | (-) |
| Control 3 | 210 | 8.75 | 0 | (-) | (-) |

(a) Hemaglutinación; (b) Efecto Citopático; (c) Postinoculación;
 (d) Los títulos representan la recíproca de la última dilución en donde se observó una HA completa.
 * No se procesó; ** No se tituló.

Experimento A (Tubos de Leighton sin laminillas)



(1) Título por ECP

(2) Título por HA

GRAFICA 1.- Curva de multiplicación del Paramyxovirus porcino LPM (titulado por efecto citopático (ECP) y por hemaglutinación (HA)), en la línea celular PK-15, utilizando - 0.009 DFEC/célula.

varió entre $10^{4.12}$, $10^{3.75}$ y $10^{4.87}$. A los 4.08, 4.4 y 4.75 días el título bajó a $10^{4.5}$ y de ahí en adelante, como se observa en la Gráfica 1, el título fue disminuyendo gradualmente, aunque con algunas variaciones. De tal manera que al final de este experimento, a los 9.75 días, en dos tubos congelados simultáneamente, los títulos fueron de $10^{2.75}$ y $10^{2.62}$, respectivamente. Hay que señalar que a los 7.75 días se encontró un título de $10^{1.0}$; dato no considerado en la Gráfica, debido a que desde antes de inocular el monoestrato se notó que el desarrollo de estas células no era el normal, pues el pH del medio estaba muy alcalino y así se mantuvo durante todo el experimento; además las células no mostraban una morfología normal.

Los controles siempre permanecieron negativos.

Experimento B.- En este caso la MI fue de 0.09 DFEC/célula. Con esta MI se observó que el ECP se inició a las 30 h PI (Cuadro 2), a los 2.25 días (54 h), el ECP fue de 20% y 12 h después, a los 2.75 días (66 h), el ECP se incrementó considerablemente hasta alcanzar un 80%. En las dos observaciones siguientes hubo diferencia en el ECP de cada uno de los dos monoestratos observados, ya que a los 3.25 días se encontró 90% en un monoestrato, mientras que hubo 70% en el otro. A los 3.75 días también fue de 60% en un monoestrato y 80% en el otro. Aunque en general, de los 2.75 a los 4.75 días, el ECP fue de 80%. A los 5.25 días se encontró un 95% de ECP en ambos monoestratos. Y de los 6.25 días en adelante fue del 100% en todos los monoestratos.

Al titular por HA los sobrenadantes, se detectó al antígeno a las 18 h PI en una de las muestras (con título de $1:2/0.05$ ml), mientras que el otro sobrenadante congelado a la misma hora resultó negativo (por HA y ECP) (Cuadro 2). El sobrenadante positivo por HA tuvo un título, por ECP, de $10^{1.12}$ DFEC / 0.025 ml. El título HA se incrementó gra-
50

dualmente, de modo que en la observación de las 30 h PI, se encontraron títulos de 1:2 y 1:4. En el siguiente muestreo, hecho a las 42 h PI ambos sobrenadantes tuvieron un título de 1:4. Posteriormente a los 2.25 días (54 h) se encontró un título de 1:8 en un sobrenadante (el otro sobrenadante no se tituló). En el muestreo hecho a los 2.75 días ambos sobrenadantes alcanzaron un título de 1:16. Entre los 2.75 y 4.25 días los títulos oscilaron entre 1:8 y 1:16. En las tres observaciones siguientes (4.75, 5.25 y 6.25 días) los títulos variaron de 1:16 a 1:32. A los 7.25 días los títulos fueron de 1:32 y 1:64. En la siguiente observación ambos sobrenadantes mostraron títulos de 1:16. Finalmente a los 9.25 días el título fue de 1:32 y a los 10.25 días de 1:64.

Al titular los sobrenadantes con base en el ECP, se logró detectar al virus en uno de los sobrenadantes congelados a las 18 h PI con un título de $10^{1.12}$ DFEC /0.025 ml; el otro sobrenadante congelado a la misma hora resultó negativo. El título viral fue aumentando gradualmente (Cuadro y Gráfica 2), de tal forma que a las 30 h se encontraron títulos de $10^{2.25}$ y $10^{2.62}$, en la siguiente observación, a las 42 h (1.75 días), hubo ligero ascenso en los títulos ($10^{2.75}$ y $10^{3.5}$). A los 2.25 días, los títulos aumentaron a $10^{3.75}$ y $10^{4.12}$. En las tres observaciones siguientes, correspondientes a los 2.75, 3.25 y 3.75 días, sólo se tituló un sobrenadante en cada observación, y los títulos fueron $10^{4.12}$ y $10^{4.25}$, respectivamente. A los 4.25 días se alcanzaron títulos de $10^{4.12}$ y $10^{4.12}$. A partir de entonces, los títulos virales fueron disminuyendo gradualmente, de tal manera que en el único sobrenadante de los 4.75 días, el título fue de $10^{3.5}$. Entre los 5.25 y 8.25 días, los títulos variaron entre $10^{3.12}$ y $10^{4.12}$. Para que finalmente, en los sobrenadantes de los 9.25 y 10.25 días, los títulos bajaran hasta $10^{3.0}$.

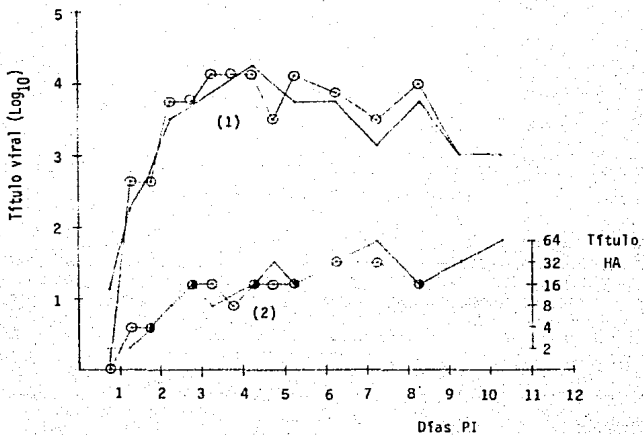
Los controles siempre permanecieron negativos.

Cuadro 2.- Experimento B: Título por HA (a) y por ECP (b) del virus L₁ inoculado en células PK-15, preparadas en tubos de Leighton con laminilla, cosechando el líquido sobrenadante a diferentes periodos.

| Tubo No. | Horas PI (c) | Días PI | ECP (%) | Título HA/O.05 ml | Título HA X (e) | Título ECP Log /0.025 ml 10 ⁰ | Título ECP X (f) |
|----------|--------------|---------|----------|-------------------|-----------------|------------------------------------------|------------------|
| 1 a | 18 | 0.75 | 0 | 2 (d) | 2 (d) | 1.12 | 0.56 |
| 1 b | | | 0 | (-) | (-) | (-) | |
| 2 a | 30 | 1.25 | Indicios | 2 | 3 | 2.25 | 2.49 |
| 2 b | | | Indicios | 4 | 4 | 2.62 | |
| 3 a | 42 | 1.75 | 10 | 4 | 4 | 2.75 | 2.68 |
| 3 b | | | 10 | 4 | 4 | 2.62 | |
| 4 a | 54 | 2.25 | 20 | 8 | 8 | 3.5 | 3.62 |
| 4 b | | | 20 | ND (g) | ND | 3.75 | |
| 5 a | 66 | 2.75 | 80 | 16 | 16 | ND | 3.75 |
| 5 b | | | 80 | 16 | 16 | 3.75 | |
| 6 a | 78 | 3.25 | 90 | 8 | 12 | ND | 4.12 |
| 6 b | | | 70 | 16 | 16 | 4.12 | |
| 7 a | 90 | 3.75 | 60 | ND | 8 | ND | 4.12 |
| 7 b | | | 80 | 8 | 8 | 4.12 | |
| 8 a | 102 | 4.25 | 80 | 16 | 16 | 4.25 | 4.18 |
| 8 b | | | 80 | 16 | 16 | 4.12 | |
| 9 a | 114 | 4.75 | 80 | 32 | 24 | ND | 3.5 |
| 9 b | | | 70 | 16 | 16 | 3.5 | |
| 10 a | 126 | 5.25 | 95 | 16 | 16 | 3.75 | 3.93 |
| 10 b | | | 95 | 16 | 16 | 4.12 | |
| 11 a | 150 | 6.25 | 100 | ND | 32 | 3.75 | 3.8 |
| 11 b | | | 100 | 32 | 32 | 3.87 | |
| 12 a | 174 | 7.25 | 100 | 64 | 24 | 3.12 | 3.3 |
| 12 b | | | 100 | 32 | 32 | 3.5 | |
| 13 a | 198 | 8.25 | 100 | 16 | 16 | 3.75 | 3.87 |
| 13 b | | | 100 | 16 | 16 | 4.0 | |
| 14 | 222 | 9.25 | 100 | 32 | 32 | 3.0 | 3.0 |
| 15 | 246 | 10.25 | 100 | 64 | 64 | 3.0 | 3.0 |
| C1* | 90 | 3.75 | 0 | (-) | (-) | (-) | (-) |
| C2* | 150 | 6.25 | 0 | (-) | (-) | (-) | (-) |
| C3* | 246 | 10.25 | 0 | (-) | (-) | (-) | (-) |

(a) Hemaglutinación; (b) Efecto citopático; (c) Postinoculación; (d) Los títulos representan la recíproca de la última dilución en donde se observó una HA completa; (e) Título por HA "promedio"; (f) Título por ECP "promedio"; (g) No determinado.
* Controles 1, 2 y 3.

Experimento B (Tubos de Leighton con laminillas)



- = Serie a
- = Serie b
- = Mismo título HA para ambas muestras (a y b)

(1) Título por ECP

(2) Título por HA

GRAFICA 2.- Curva de multiplicación del Paramyxovirus porcino LPM (titulado por efecto citopático (ECP) y por hemaglutinación (HA)), en la línea celular PK-15, utilizando - 0.09 DFEC/célula

Experimento C.- En este experimento se utilizaron aproximadamente 0.02 DFEC/célula, para infectar a los monoestratos. Con esta MI, el ECP se inició a los 1.7 días PI (Cuadro 3), y se incrementó de manera gradual, de modo que a los 3.2 días fue de 50-60%, a los 4.2 días fue del 80%, y a partir de los 7.2 días del 100%. A las 17 h PI no fue posible detectar al virus ni por HA, ni por ECP, sin embargo, 12 h después (29 h), ya se logró detectar al virus, encontrando un título por HA de 1:2/0.05 ml y por ECP de $10^{3.0}$ DFEC / 0.025 ml. Ambos títulos aumentaron en forma gradual, aunque con algunas variaciones (Cuadro y Gráfica 3).

La HA que se detectó a las 29 h PI (1.2 días) presentó un título de 1:2; y aumento a 1:8 en las dos observaciones siguientes (1.7 y 2.2 días). En la siguiente observación, a los 2.7 días, el título aumentó a 1:32. A los 3.2 días bajó una dilución (1:16). En las tres observaciones siguientes (3.7, 4.2 y 4.7 días), el título fue de 1:32. Posteriormente, a los 5.2 y 6.2 días el título fue de 1:16. Para aumentar hasta 1:64 a los 7.2 y 8.2 días. Finalmente, de los 9.2 a los 12.2 días los títulos fueron de 1:32, con excepción de la muestra correspondiente a los 11.2 días, que tuvo un título de 1:16.

Al igual que la HA, se detectó al virus por ECP a las 29 h PI, observándose un título de $10^{3.0}$ DFEC / 0.025 ml. El título viral aumentó a $10^{4.12}$ en las dos observaciones siguientes (1.7 y 2.2 días). En la siguiente observación (2.7 días) fue de $10^{4.0}$, aumentando hasta $10^{4.75}$ a los 3.2 días; y bajando a $10^{4.5}$ a los 3.7 días. Posteriormente el título decreció hasta $10^{3.5}$ a los 4.2 días. El título volvió a aumentar en las siguientes observaciones, alcanzando los títulos más altos entre los 7.2 y 9.2 días ($10^{4.75}$ y $10^{4.87}$), respectivamente. En las dos últimas observaciones, el título viral volvió a decrecer siendo de $10^{2.5}$ a los 12.2 días. Como puede observarse en el Cuadro 3, a los 5.2 y 11.2 días PI, los

Cuadro 3.- Experimento C: Título HA (a) y por ECP (b) del virus LPM inoculado en células PK-15, preparadas en botellas de DL (c), cosechando el líquido sobrenadante y las células a diferentes periodos.

| Botella de DL No. | Horas PI (d) | Días PI | ECP (%) | Título HA/0.05 ml | Título ECP Log ₁₀ /0.025 ml |
|-------------------|--------------|---------|----------|-------------------|----------------------------------------|
| 1 | 17 | 0.7 | 0 | (-) | (-) |
| 2 | 29 | 1.2 | 0 | 2 (e) | 3.0 |
| 3 | 41 | 1.7 | Indicios | 8 | 4.12 |
| 4 | 53 | 2.2 | 20 | 8 | 4.12 |
| 5 | 65 | 2.7 | 30-40 | 32 | 4.0 |
| 6 | 77 | 3.2 | 50-60 | 16 | 4.75 |
| 7 | 89 | 3.7 | 70-80 | 32 | 4.5 |
| 8 | 101 | 4.2 | 80 | 32 | 3.5 |
| 9 | 113 | 4.7 | 90 | 32 | 3.87 |
| 10 | 125 | 5.2 | 95 | 16 | 1.55 |
| 11 | 149 | 6.2 | 95 | 16 | 4.12 |
| 12 | 173 | 7.2 | 100 | 64 | 4.87 |
| 13 | 197 | 8.2 | 100 | 64 | 4.75 |
| 14 | 221 | 9.2 | 100 | 32 | 4.87 |
| 15 | 245 | 10.2 | 100 | 32 | 2.75 |
| 16 | 269 | 11.2 | 100 | 16 | 1.0 |
| 17 | 293 | 12.2 | 100 | 32 | 2.5 |
| Control 1 | 125 | 5.2 | 0 | (-) | (-) |
| Control 2 | 293 | 12.2 | 0 | (-) | (-) |

(a) Hemaglutinación.

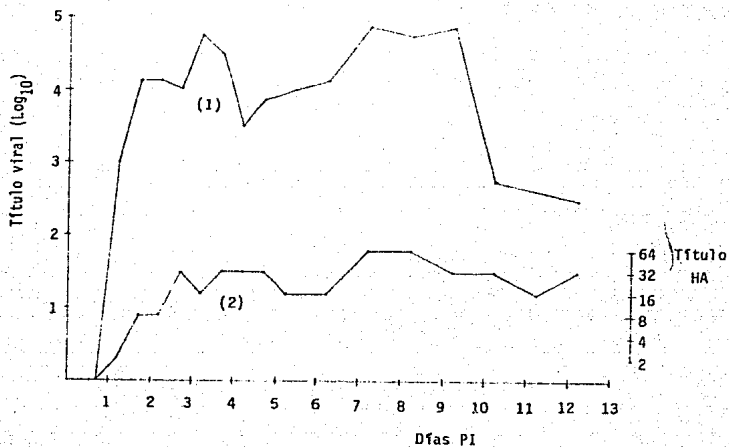
(b) Efecto citopático.

(c) Dilución de leche.

(d) Postinfección.

(e) Recíproca de la última dilución en donde hubo una HA completa.

Experimento C (Botellas de dilución de leche)



(1) Título por ECP

(2) Título por HA

GRAFICA 3.- Curva de multiplicación del Paramyxovirus porcino LPM (titulado por efecto citopático (ECP) y por hemaglutinación (HA)), en la línea celular PK-15, utilizando - 0.02 DFEC/célula.

títulos obtenidos por ECP fueron muy bajos ($10^{1.5}$ y $10^{1.0}$). Estos dos datos no se consideraron en la Gráfica 3, porque en ambos casos el crecimiento de los monoestratos no fue normal y el pH del medio siempre se mantuvo anormalmente alcalino. Lo cual indica que el metabolismo de las células no fue el normal. Por otra parte, en el resto de los monoestratos inoculados y en los controles, el pH del medio se mantuvo siempre dentro del rango esperado.

CAMBIOS CELULARES.

Experimento B:

El monoestrato control No. 2 (no inoculado).- Fue fijado a las 150 h PI y se encontró que estaba homogéneo, con 100% de confluencia celular, escasas células con núcleo gigante (4 veces más de lo normal), núcleos redondos y ovales, y escasas vacuolas intracitoplásmicas (IC).

MONOESTRATOS INOCULADOS.

Los cambios observados en los monoestratos inoculados con el virus LPM, correspondientes a las laminillas del experimento B, se describen a continuación:

Monoestrato 1.- Al ser fijado a las 18 h PI, se observó que estaba homogéneo, con 100% de confluencia, escasas células con núcleo gigante, gran actividad celular (5 células en mitosis por campo observado). Se notó una zona con marcada separación entre los límites celulares (entre las membranas citoplásmicas); y marcada separación de los núcleos con respecto al citoplasma de las células correspondientes.

Monoestrato 2.- Fijado a las 30 h PI mostró monoestrato homogéneo, 100% de confluencia y núcleos más grandes que los del monoestrato control fijado a las 150 h PI; gran actividad celular (3 células en mitosis/campo), marcada separación de los límites celulares y marcada separación entre el nú-

cleo y el citoplasma de cada célula.

Monoestrato 3.- Fijado a las 42 h PI, estaba homogéneo, con 100% de confluencia, escasas células gigantes, núcleos de mayor tamaño que los del monoestrato control. Había menos células en mitosis (0 a 1 célula/campo). Se mantenía la separación entre los límites celulares. Además, se observó una zona en donde había separación del núcleo y el citoplasma de cada célula; en otra zona del monoestrato esta alteración no se presentó. También se observó una moderada cantidad de vacuolas IC.

Monoestrato 4.- Fijado a las 54 h PI, con 100% de confluencia, núcleos homogéneos, escasas células gigantes, escasas células en mitosis, separación entre los límites celulares y moderada cantidad de vacuolas IC.

Monoestrato 5.- Fijado a las 66 h PI, con 98% de confluencia, núcleos homogéneos, escasas células en mitosis, se mantuvo la separación entre los límites celulares, y hubo moderada cantidad de vacuolas IC.

Monoestrato 6- No fue teñido.

Monoestrato 7.- Fijado a las 90 h PI, con 98% de confluencia, núcleos homogéneos, escasas células en mitosis, mayor presencia de células con núcleo gigante, la separación celular estaba menos marcada y había moderada cantidad de vacuolas IC.

Monoestrato 8.- Fijado a las 102 h PI, con 100% de confluencia, escasas células en mitosis, había una zona con separación entre los núcleos y los citoplasmas celulares. Presencia de grandes grupos de células en diferentes fases de muerte celular. Moderada cantidad de vacuolas IC.

Monoestrato 9.- Fijado a las 114 h PI, con 90% de confluencia, escasas células en mitosis. Presencia de grupos de cé-

lulas en diferentes fases de muerte celular y gran cantidad de células, separadas del monoestrato. Núcleos picnóticos, reducidos de tamaño, y moderada cantidad de vacuolas IC.

Monoestrato 10.- Fijado a las 126 h PI, con 80% de confluencia. Presencia de agrupaciones celulares con diferentes grados de muerte celular. Gran cantidad de núcleos picnóticos reducidos de tamaño. Células con núcleos mostrando cariorrexis o cariólisis; citoplasmas acidofílicos (muerte celular). Mayor distancia entre célula y célula (separación del monoestrato). Gran cantidad de vacuolas IC.

Monoestrato 11.- Fijado a las 150 h PI, únicamente existía el 50% del monoestrato; sin embargo, sólo un 25-30% del monoestrato contenía células vivas. Había gran cantidad de núcleos picnóticos, reducidos de tamaño, con cariorrexis o cariólisis y gran cantidad de vacuolas IC.

Monoestrato 12.- Fijado a las 174 h PI, en el cual casi no había células.

Monoestrato 13.- Fijado a las 198 h PI, en el cual ya no había células.

EFFECTO CITOPATICO.

En los Experimentos A, B y C, el efecto citopático (ECP), provocado por el virus LPM, en los monoestratos de células PK-15, se inició entre los 1.25 y 1.75 días PI; y fue completo (100%), entre los 6.25 y 7.4 días. Consistió en: Inicialmente se observaron grumos de células (de 5-20 células) pegados a la superficie del vidrio y muchas células individuales, muertas, flotando en el medio. Células redondas dentro del monoestrato (10-30 o más por campo observado); y células redondas individuales, aumentadas de tamaño y pegadas al vidrio. Posteriormente (53-77 h PI) se empezaron a observar espacios vacíos en el monoestrato, donde ca-

brian desde una, hasta 5 ó 6 células normales; más tarde, los espacios aumentaron de tamaño y en cantidad, observándose 10-15 espacios por campo (y en cada espacio cabrían de 5 a 10 células normales o hasta 30 células). En las botellas de DL se observaron espacios de 1-2 cm de diámetro. Aproximadamente al mismo tiempo de que se iniciaba la formación de espacios en el monoestrato, se empezaron a observar gran cantidad de "racimos" de células (3-6 células por racimo) flotando en el medio. También se observaron racimos de células (5-15 o hasta 50 células por racimo) que estaban sujetos por un apéndice al monoestrato y que se movían al agitar el medio, sin despegarse. Finalmente se observaron células agrandadas y alargadas con forma parecida a las "neuronas" (células estrelladas), y células redondas arrugadas pegadas al vidrio.

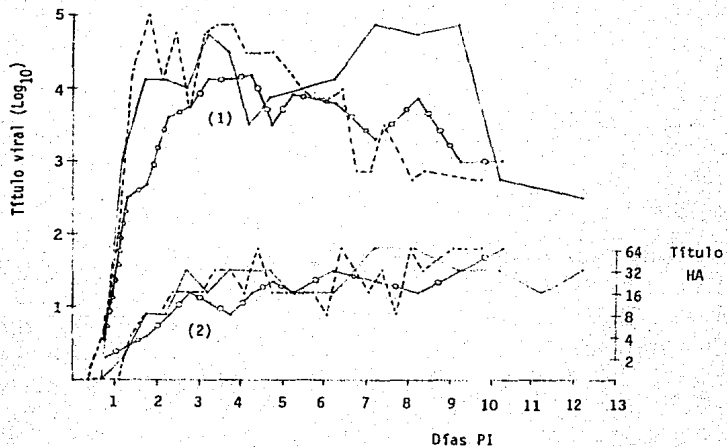
DISCUSION

DETECCION DEL VIRUS.

En el Experimento B, en el que se titularon los sobrenadantes (virus extracelular), en una de las dos muestras congeladas a las 18 h PI, fue posible detectar al virus por HA y por ECP, mientras que en la otra muestra no se detectó la presencia del virus por ninguna de estas dos pruebas (Cuadro 2). Por otro lado, en los Experimentos A y C en los que se tituló la mezcla del líquido sobrenadante y de las células congeladas, en el Experimento C, no se detectó al virus a las 17 h PI, pero sí a las 29 h PI (Cuadro 3); mientras que en el Experimento A, sí fue posible detectar al virus a las 18 h PI (Cuadro 1). Todo esto indica que es muy probable que el periodo de latencia del Paramyxovirus porcino LPM sea de aproximadamente 17-18 h. Este dato se aproxima a lo mencionado para el virus de la Parotiditis, en el cual, el periodo de eclipse es de 16-18 h (11); y para el virus del Moquillo Canino, en el cual, un ciclo de crecimiento tiene una duración de aproximadamente 18 h (15).

MAXIMA PRODUCCION VIRAL, MEDIDA POR ECP.

En la Gráfica 4 y en los Cuadros 1, 2 y 3, se observa que los máximos títulos detectados por ECP, en el Experimento A, se encontraron entre los 1.75 y los 3.75 días PI; en el Experimento B entre los 3.25 y 4.25 días; y en el Experimento C, los máximos títulos se encontraron en dos momentos diferentes: primero entre los 1.7 y 3.7 días PI y posteriormente entre los 7.2 y 9.2 días. Al observar, en la Gráfica 4, las 3 curvas de multiplicación viral obtenidas de los 3 experimentos, se aprecia que inicialmente los máximos títulos por ECP correspondieron aproximadamente a las muestras cosechadas entre los 2 y los 4 días PI. A pesar de haber



- - - - - = TL sin laminillas (Exp. A) (MI = 0.009)
 - ○ - - - = TL con laminillas (Exp. B) (MI = 0.09)
 - - - - - = Botellas de DL (Exp. C) (MI = 0.02)

(1) Título por ECP

(2) Título por HA

GRAFICA 4.- Comparación de las tres curvas de multiplicación del Paramyxovirus porcino LPM, en la línea celular PK-15.

usado 3 MI diferentes (0.009, 0.09 y 0.02 DFEC/célula), en los Experimentos A, B y C, respectivamente, las 3 curvas de multiplicación tienen ciertas similitudes, ya que hubo pocas diferencias notables entre las 3 curvas, en la primera mitad del estudio. En la segunda mitad, en el Experimento C, se obtuvieron 2 picos de producción más altos (Gráfica 3). Estas diferencias entre las 3 curvas, probablemente se deban a las distintas MI usadas. Sin embargo, las 3 MI utilizadas fueron bajas, y sería conveniente realizar más experimentos para conocer el comportamiento del virus al usar MI más altas.

Al observar las curvas de cada uno de los experimentos (Gráficas 1, 2 y 3), se nota que no hay un crecimiento continuo sino que hay altibajas en los títulos obtenidos por ECP. Estas variaciones quizás se deban a las bajas MI empleadas. Lo que probablemente ocasionó que muchas células, que no se infectaron al momento de inocular los monoestratos, se infectaron posteriormente; ya sea con virus extracelular o por infección de célula a célula. Las variaciones también pueden deberse a diferencias individuales entre los 57 monoestratos de los TL, o entre los 17 monoestratos de las botellas de DL, utilizados.

En general se pudo apreciar que el título viral, calculado por ECP, alcanzó los títulos máximos de $10^{4.25}$ en los sobrenadantes (virus extracelular) (Cuadro y Gráfica 2); mientras que en los especímenes en los que se congelaron células y sobrenadantes (Experimento A), el título llegó a ser hasta de $10^{5.0}$ (Cuadro y Gráfica 1). Este título viral, en el Experimento A, aumentó más rápido y alcanzó niveles ligeramente más altos y declinó más rápidamente que el título viral detectado en las botellas de DL (Experimento C), en las cuales los títulos altos persistieron hasta el noveno día; para entonces en los sobrenadantes sin células (Experimento B) (TL con laminilla), y con células (TL sin laminilla), el

título ya había descendido aproximadamente 2 logaritmos (Gráfica 4).

Hay que señalar que el título por ECP disminuyó gradualmente conforme el virus permaneció por más días a 37 C. Este mismo fenómeno fue observado en otro trabajo en el que se estudió la viabilidad del Paramyxovirus porcino a diferentes temperaturas (10).

TITULACION POR HA.

Las curvas obtenidas en los 3 experimentos, al titular por HA, se comportaron de manera diferente a sus curvas correspondientes obtenidas por ECP; ya que los títulos más altos por HA se encontraron hacia el final de los experimentos (Cuadros y Gráficas 1, 2 y 3), cuando ya los títulos por ECP estaban decreciendo o ya habían disminuido notablemente. Esto puede deberse a que el Paramyxovirus porcino LPM es estable, en cuanto a su capacidad HA, pues se ha encontrado que conserva esta capacidad por 110 días o más de tratamiento a 37 C (10). Debido a esto no se obtuvo, en la parte final de los experimentos, un descenso de la curva. Los datos encontrados en la parte final de los experimentos, nos indican que pueden haber lotes de virus con altos títulos detectables por HA, pero con cada vez más bajos títulos de virus con capacidad infectante para las células PK-15. Pocas veces se encontraron muestras que tuvieran simultáneamente altos títulos por ECP y altos títulos por HA. Por ejemplo: las muestras colectadas a los 3.4 y 3.75 días PI del Experimento A (Cuadro y Gráfica 1); y a los 7.2 y 8.2 días PI en el Experimento C (Cuadro y Gráfica 3). Por otro lado, en la parte inicial de los Experimentos A y C, se encontraron muestras que tuvieron altos títulos por ECP y bajos títulos por HA. Esto sucedió en el Experimento A, entre los 1.75 y 3.08 días PI (Cuadro y Gráfica 1); y en el Experimento C, a los 1.7,

2.2 y 3.2 días PI (Cuadro y Gráfica 3). En el Experimento B, esto no se observa claramente, porque cuando hubo títulos altos por ECP, los títulos por HA fueron bajos y estaban ascendiendo (Cuadro y Gráfica 2). Lo anterior indica que puede suceder que se obtenga un título alto por ECP, aunado a un título bajo por HA y viceversa; por lo tanto, esto quiere decir que no necesariamente hay una correlación entre el título por HA de una muestra y el título por ECP de esa misma muestra. Los títulos por HA, tanto en el Experimento A como en el Experimento C (Cuadros y Gráficas 1 y 3, respectivamente), aumentaron un poco más rápido que los encontrados en el Experimento B (Cuadro y Gráfica 2), donde sólo se titularon los sobrenadantes (virus extracelular).

En general, los títulos más altos por HA (1:32-1:64), se obtuvieron a partir de los 6-7.2 días PI. Pero fue posible obtener títulos de 1:32 o mayores desde antes. O sea desde los 2.7 días PI en el Experimento C (Cuadro y Gráfica 3); a partir de los 3.4 días en el Experimento A (Cuadro y Gráfica 1); y desde los 4.75 días en el Experimento B (Cuadro y Gráfica 2).

Al relacionar el título HA con el título por ECP, encontramos que, para poder detectar una unidad hemaglutinante (UHA), en el Experimento B, fue necesaria la presencia de aproximadamente 26.36 DFEC /0.05 ml, del virus LPM ($10^{1.12}$ /0.025 ml, a las 18 h PI) ⁵⁰ (Cuadro 2). En el Experimento C, se necesitaron 2000 DFEC /0.05 ml ($10^{3.0}$ /0.025 ml, a los 1.2 días PI) (Cuadro 3). Y en el Experimento A, fueron necesarias 50 000 DFEC /0.05 ml, a los 1.75 días PI (Cuadro 1). La gran diferencia en el número de DFEC necesarias para detectar una UHA, probablemente podría deberse a que al principio hay partículas virales (viriones) con capacidad infectante pero sin capacidad HA. En otro estudio, se encontró que al darle a este virus 7 pases consecutivos, inoculándolo en embrión de pollo, por la vía del saco de la yema,

producía la muerte de estos embriones en 3 ó 4 días; pero no se pudo detectar actividad HA en los líquidos de la yema y saco amniótico, en ninguno de estos 7 pases. Sin embargo si se pudo detectar la replicación viral por medio de las pruebas de hemoadsorción y por ECP, cuando los fluidos de cada uno de estos pases fueron inoculados en células PK-15. Después de 10 pases seriados, el virus LPM fue adaptado a crecer en el saco de la yema y en el saco amniótico. Y entonces mostró títulos HA de 1:8 a 1:64 (30). Se señala, en el caso del virus de la Enfermedad de Newcastle, que aproximadamente 100 000 unidades infectantes virales equivalen a una UHA (1).

Se menciona que el ECP en células PK-15 se inicia a los 2 días PI y es completo a los 5 días PI (30). Esto se asemeja mucho a lo encontrado en este estudio, pues en los Experimentos A y C (Cuadros 1 y 3 respectivamente), el ECP se inició a los 1.7 días y fue completo alrededor de los 7 días PI. Mientras que en el Experimento B (Cuadro 2), el ECP se inició a los 1.25 días y fue completo a los 6.25 días PI. El ECP en el Experimento B (Cuadro 2), se presentó más rápido que en los Experimentos A y C (Cuadros 1 y 3), esto quizás se deba a que en el Experimento B se inocularon las células con 0.09 DFEC/célula; mientras que en los Experimentos C y A se utilizaron 0.02 y 0.009 DFEC/célula.

En los 3 experimentos, fue posible detectar al virus por HA y por ECP antes de que hubiera ECP en el monoestrato (Cuadros 1, 2 y 3).

Al relacionar el grado de ECP observado en el microscopio invertido con el título por ECP, se observa que: en el Experimento A (Cuadro 1), los máximos títulos se encontraron entre los 1.75 y 3.75 días PI; cuando apenas había desde indicios de ECP y hasta un 50% de ECP. En el Experimento B (Cuadro 2), los máximos títulos estuvieron entre los 3.25 y

4.25 días PI; en este lapso, el grado de ECP estuvo alrededor del 80% (60-90%). En el Experimento C (Cuadro 3), los títulos más altos se encontraron en 2 momentos diferentes, primero entre 1.7 y 3.7 días PI cuando el grado de ECP, oscilaba entre el inicio y un 80%, respectivamente; y posteriormente entre los 7.2 y 9.2 días, cuando el ECP fue del 100%. Como se mencionó anteriormente, los títulos más altos por HA se encontraron a partir de los 6-7 días PI, cuando el ECP era ya de 100% (Cuadros 1, 2 y 3). En base a estos datos podemos decir que no necesariamente hay que esperar a que el grado de ECP sea considerable para poder obtener buenos títulos, medidos por ECP; ya que puede suceder que se obtengan buenos títulos cuando el grado de ECP apenas se inicia. De modo contrario, es preferible esperar a que el grado de ECP sea considerable (80% o más) para poder obtener buenos títulos por HA.

CAMBIOS CELULARES.

Finalmente, se señala en la literatura que las células PK-15 inoculadas con el virus LPM y posteriormente teñidas con hematoxilina y eosina, mostraron vacuolización del citoplasma en un plazo de 10 h PI, seguida por formación de sincitios que a menudo contenían más de 50 núcleos (30). En cambio, en el presente trabajo, la vacuolización del citoplasma se empezó a notar a las 42 h PI. En el trabajo citado (30), se menciona que dentro de las primeras 24 h PI se observaron células con citoplasma acidófilo, núcleo picnótico, cariorrexis y cariólisis; en cambio en este trabajo estos cambios se observaron a partir de las 102 h PI; y a las 18 y 30 h PI no se observó muerte celular (picnosis, cariorrexis y cariólisis), sino células en mitosis. Los cambios celulares encontrados en este trabajo corresponden a los mencionados en la literatura (30). Sin embargo, los tiempos PI en los que estos se observaron no son iguales (hay diferencias

notables). Posiblemente esto se deba a las diferentes MI empleadas, y/o a características particulares en cuanto a la susceptibilidad de las células PK-15 empleadas. Ya que se han detectado células PK-15 de diferentes procedencias, que muestran diferente grado de susceptibilidad a este virus (30).

CONCLUSIONES.

- 1) El período de latencia del Paramyxovirus porcino LPM es de aproximadamente 17-18 h.
- 2) Al titular por ECP, se encontró que, inicialmente, los máximos títulos del virus LPM se obtuvieron entre los 2 y los 4 días PI, al usar 0.009, 0.09 y 0.02 DFEC/célula. Posteriormente, en la segunda etapa, hubo títulos altos entre los 7 y los 9 días PI, al emplear 0.09 y 0.02 DFEC.
- 3) Los títulos más altos por HA se obtuvieron hacia el final de los experimentos; a partir de los 6-7 días PI. Sin embargo, a partir de los 2.7 días PI, en el Experimento C, fue posible obtener un buen título por HA (1:32).
- 4) El ECP se inició entre los 1.25-1.7 días PI y fue completo (100%) entre los 6.25-7.4 días PI.
- 5) Los máximos títulos detectados con base en el ECP, en los Experimentos A y C, se obtuvieron cuando el grado de ECP, en los monoestratos, oscilaban entre indicios y 80%; y entre 60 y 90% en el Experimento B.
- 6) Los títulos más altos por HA, generalmente se encontraron cuando el grado de ECP fue de 80-100%. Sin embargo, también se obtuvo un título alto, cuando el grado de ECP fue de aproximadamente 20 y 50% (Experimento A).
- 7) No siempre hubo relación entre el alto título viral y el alto grado de ECP observado en los monoestratos.
- 8) Los títulos virales por ECP y por HA, fueron ligeramente más altos cuando se utilizaron células congeladas con sus sobrenadantes (Experimentos A y C). Y fueron ligeramente más bajos cuando se colectó solamente el sobrenadante (Experimento B).

- 9) Hubo poca relación entre el crecimiento del título detectado por ECP y el título HA. De modo que se pueden obtener altos títulos por ECP y bajos por HA, y viceversa.
- 10) Es probable que existan viriones con capacidad infectante pero sin capacidad HA.
- 11) Los cambios celulares se asemejan a los señalados en otro estudio realizado anteriormente (30).
- 12) Sería conveniente, realizar otros experimentos de este tipo, utilizando MI más altas (por ejemplo 5 y 20 DFEC/célula), para comparar los resultados con los de este trabajo.
- 13) Sería conveniente emplear otras técnicas (inmunofluorescencia, tinción con naranja de acridina, etc.), para detectar el virus, o a sus antígenos, con mayor precisión, durante las diferentes fases de multiplicación viral.
- 14) Se observó el mismo tipo de ECP en los TL con o sin laminilla, por lo tanto pueden usarse laminillas para posteriores estudios del virus.

APENDICE 1.

Solución de Tripsina

| | 1 Litro |
|-----------------------------------|-----------|
| NaCl | 8.0 gr |
| KCl | 0.4 gr |
| Dextrosa | 1.0 gr |
| NaHCO ₃ | 0.58 gr |
| Tripsina | 0.5 gr |
| *Versene EDTA | 0.2 gr |
| Rojo de Fenol (Sol. 0.5%) | 0.4 ml |
| H ₂ O Destilada c.b.p. | 1000.0 ml |

* También referido como EDTA (Ethylenediaminetetra-acetic acid).

Medir el pH, el cual debe estar abajo de 7.3. Ajustar hacia arriba con una solución al 7.5% de NaHCO₃.

Esterilizar por filtración.- Para clarificar se recomienda usar una membrana de 0.45 micras.

Repartir en las cantidades deseadas.

Congelar a -17 C. No congelar de nuevo para usar otra vez.

Tiempo de vida en almacenamiento: 6 meses.

BIBLIOGRAFIA.

- (1) Beard, C.W. and Hanson, R.P., 1984. Chapter 19. Newcastle Disease. In: Diseases of Poultry. Eighth Edition. Edited by Hofstad, M.S.; Barnes, H.J.; Calnek, B. W.; Reid, W. M.; Yoder, H. W., Jr. Editorial Board for the American Association of Avian Pathologists, Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA. pp. 452-470.
- (2) Campos M., E., 1981. "Síndrome del ojo azul o cerdos zarcos". Mem. XVII Convención AMVEC-IXTAPA, 81. Del 1 al 5 de julio de 1981.
- (3) Campos M., E.; Calderón S., E. y Solorio S., 1982. "The blue eye syndrome", Síndrome del ojo azul. Proc of the International Pig Veterinary Society, 7th Congress, México, D.F., p. 171.
- (4) Campos M., E., 1987. Hallazgos recientes en Ojo Azul. Sureste Agropecuario, Año 2, No. 1, enero 1987, p. 20.
- (5) Coles, E.H., 1957. Hemacytometer method. In: Veterinary Clinical Pathology. W.B. Saunders Company, Philadelphia and London, pp. 40-42.
- (6) Correa Girón, P., B. Rodríguez S., C. Romero R., G. Torres C., C. Sánchez H., M. Snyder. Prevención de la contaminación de los cultivos celulares (CC) por el virus de la diarrea viral bovina (BVD) mediante la inactivación con gammas a 25 KGy y por ultrafiltración del suero fetal de ternera comercial (SFTC) utilizado en los medios de cultivo. II Congreso Nacional AMVEC, Mazatlán, Sin., del 11 al 14 de julio de 1984, p. 8.
- (7) Correa G., P.; Rodríguez S., B.; Romero R., C.; Torres C., G.; Sánchez H., C.; Snyder M., 1984. Prevención de la contaminación de los cultivos celulares por el virus

de diarrea viral bovina mediante la inactivación con Gammas a 25 Kgy y por ultrafiltración del suero fetal de ternera comercial utilizado en los medios de cultivo. Mem. de la Reunión de Investigación Pecuaria en México 1984, México, D.F., p. 151.

- (8) Correa G., P.; Rodríguez S., B; Romero R., C.; Torres C., G.; Sánchez H., C.; Snyder M., 1984. Prevención de la contaminación de los cultivos celulares (CC) por el virus de diarrea viral bovina (BVD) mediante la inactivación con gammas a 25 Kgy del suero fetal de ternera comercial (SFTC) utilizado en los medios de cultivo. V Simposio sobre Química Nuclear, Radioquímica y Química de Radiaciones. Salón del Consejo de la Universidad de Guanajuato, Gto., Gto., México, dic. 4-7 de 1984, p. 58.
- (9) Correa-Girón, P.; Martínez L., A.; Ericsson, A.; Moreno-López J., 1986. Characterization of a Paramyxovirus isolated from the brain of a piglet in Mexico. Proc of the International Pig Veterinary Society, 9th Congress, July 15-18, 1986, Barcelona, Spain, p. 205.
- (10) Cruz G., H.; Martínez L., A.; Correa G., P.; Colinas T., A., 1988. Viabilidad del Paramyxovirus porcino de La Piedad Michoacán (Pp-LPM) a diferentes temperaturas. Mem. XXIII Congreso Anual AMVEC, León, Guanajuato, julio 20-24 de 1988. pp. 84-86.
- (11) Davis, B., D.; Dulbecco, R.; Eisen, H. N.; Ginsberg, H. S., 1985. Tratado Microbiología, 3a. Edición, Salvat Editores, Barcelona, España, pp. 695-725, 790-931.
- (12) Davis, B., D.; Dulbecco, R.; Eisen, H. N.; Ginsberg, H. S., 1980. Chapter 50. Multiplication and genetics of animal viruses In: Microbiology Including Immunology and Molecular Genetics. Third Edition. Harper and Row, Publishers, Philadelphia. pp. 967-999.

- (13) García G., J.; Camacho M., J.; Mendoza E., S.; Ciprián C., A.; González G., S.; Díaz C. y Stephano H., A., 1988. Infección experimental con el virus de ojo azul y *Pasteurella multocida* en cerdos convencionales. Mem. XXIII Congreso Anual AMVEC, León, Guanajuato, julio 20-24 de 1988. pp. 87-89.
- (14) Gay G., M.; Stephano H., A.; Vergara Ll., M., 1985. Determinación de anticuerpos contra un virus aislado en cerdos afectados con el síndrome del ojo azul en sueros de perros en contacto. Mem. XX Reunión Nacional AMVEC-85, Mérida, Yucatán, 10-13 de julio, pp. 69-70.
- (15) Gillespie, J.H., and Timoney, J.F., 1981. 50. The Paramyxoviridae. In: Hagan and Bruner's Infectious Diseases of Domestic Animals. Seventh Edition. Comstock Publishing Associates, a division of Cornell University Press, Ithaca and London. pp. 720-757.
- (16) González P., F., J., 1986. Situación actual y perspectivas de la porcicultura. Porcírama. Año 11, Vol. XI, No. 124. pp. 6-40.
- (17) Guillén A., H.; Barba L., R., J., 1984. Estudio de un brote de una nueva enfermedad denominada síndrome del ojo azul de los porcinos. Mem. II Congreso Nacional AMVEC. Mazatlán, Sinaloa, julio 11 al 14 de 1984, pp. 100-101.
- (18) Jawetz E.; Melnick J., L.; Adelberg E., A., 1981. Manual de Microbiología Médica, 9a. Ed., El Manual Moderno, México, D.F. pp. 319-328.
- (19) Jenney, E.W., and Snyder, M.L., 1981. Microtitration Serology Methods for Bovine Virology. Parainfluenza-3 Hemagglutination-Inhibition Test. In: Serologic Microtitration Technics, U.S. Department of Agriculture Animal and Plant Health Inspection Service, Veterinary Servi-

ces, National Veterinary Services Laboratory, Ames, Iowa. June, 1981, pp. 37-39.

- (20) Luna, L.G., 1968. Chapter 1. Preparation of Tissues. Clarke's Solution In: Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. Third Edition. McGraw-Hill Book Company. p.5.
- (21) Martínez L., A.; Correa G., P.; Fajardo M., R.; Garibay S., M., 1985a. Aislamiento y estudio de un virus porcino parecido a los Paramyxovirus. Encuentro sobre enfermedades infecciosas del cerdo. AMVEC. Ed. por P. Correa y A. Morilla. Centro Médico Nal. del IMSS. México, D.F., 6 y 7 de mayo, pp. 15-21.
- (22) Martínez L., A.; Correa G., P.; Fajardo M., R.; Ramos R., I.; Garibay S., M.; Moreno-López, J., 1985b. Un virus parecido a los Paramyxovirus productor de signos respiratorios, nerviosos y mortalidad en cerdos. Resúmenes XVI Cong. Nal. de Microbiología. AMM. Durango, Dgo., 11-15 de agosto de 1985. p. 83.
- (23) Martínez L., A.; Correa G., P.; Fajardo M., R.; Garibay S., M.; Moreno L., J.; Ramos R., I.; Rosales E., F., 1985c. Un virus hemoaglutinante similar a los Paramyxovirus que produce encefalitis y mortalidad en cerdos. Mem. de la Reunión de Investigación Pecuaria en México 1985, México, D.F., p. 81.
- (24) Martínez L., A.; Correa G., P.; Rosales E.J.A.F.; Vásquez P.C.G.; Garibay S., M., 1987. Curva de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación contra el Paramyxovirus porcino de La Piedad, Michoacán, en cerdos de una granja de ciclo completo. Técnica Pecuaria en México. Vol. 25, No. 2, mayo-agosto 1987. pp. 163-167.

- (25) Martínez L., A.; Colinas T., A.; Correa G., P.; Ramírez N., R.; Garibay S., M.; Coss, M.; Báez, A.; Coba A., A., 1987. Determinación de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación contra el Paramyxovirus LPM en cerdos con signos nerviosos, con y sin opacidad de córnea. Mem. II Congreso ALVEC, XXII Convención AMVEC, III Encuentro UNPC. Acapulco, México, 22-25 de septiembre 1987. pp. 76-78.
- (26) Martínez L., A.; Correa G., P.; Colinas T., A.; Galina P., L., 1988. Opacidad corneal bilateral en lechones de una cerda inoculada con el Paramyxovirus porcino de La Piedad, Michoacán (Pp-LPM). Mem. Reunión de Investigación Pecuaria en México 1988. p. 54.
- (27) Martínez L., A. y P. Correa, 1989. Comunicación personal. INIFAP-SARH, Km. 15.5 carr. México-Toluca.
- (28) Matthews, R.E.F., 1982. Classification and Nomenclature of Viruses. Fourth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. S. Karger. Medical and Scientific Publishers. Basel, München, Paris, London, New York, Tokyo, Sydney. pp. 104-105.
- (29) Mohanty S., B.; Dutta S., K., 1983. Virologia Veterinaria. Nueva Editorial Interamericana, México, D.F. pp. 31-55.
- (30) Moreno-López, J.; Correa-Birón, P.; Martínez L., A.; Ericsson, A., 1986. Characterization of a Paramyxovirus Isolated from the Brain of a Piglet in Mexico. Arch Virol 91: pp. 221-231.
- (31) Pérez E., R. Aspectos económicos de la porcicultura en México: 1960-1985, Asociación Americana de la soya. pp. 8-13, 25 y 361.

- (32) Pérez P., F.; Stephano H., A.; Gay G., M., 1988. Estudio histológico en lechones inoculados experimentalmente con el Paramyxovirus de ojo azul. Mem. XXIII Congreso Anual AMVEC, León, Guanajuato, julio 20-24 de 1988, pp. 81-83.
- (33) Ramírez N., R.; Martínez L., A.; Correa G., P.; Colinas T., A., 1987. Un brote de Paramyxovirus encefalítica en cerdos de una granja del Estado de México. Mem. II Congreso ALVEC, XXII Convención AMVEC, III Encuentro UNPC. Acapulco, México, 22-25 de septiembre 1987. pp. 64-67.
- (34) Ramírez T., C.; Stephano H., A., 1982. Histological central nervous in naturally infected piglets. Proc. of the International Pig Veterinary Society, 7th Congress, México, D.F., p. 154.
- (35) Rosales E., F.; Ramos R., I.; Correa G., P.; Martínez L., A., 1987. Análisis retrospectivo de la presencia de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación contra el Paramyxovirus porcino LPM, en sueros de cerdos colectados de 1972 a 1986. Mem. XXI Reunión Nacional, Asociación Mexicana de Producción Animal, AMPA-87, Cd. Victoria, Tamaulipas, octubre 29-31, 1987. p. 163.
- (36) Rosales E., F.; Ramos R., I.; Sánchez-Mejorada P., H.; Correa G., P., 1987. Anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación (IH) contra el Paramyxovirus porcino LPM en cerdas y ratas de las mismas granjas. Mem. XXI Reunión Nacional, Asociación Mexicana de Producción Animal, AMPA-87, Cd. Victoria, Tamaulipas, octubre 29-31, 1987. p. 164.
- (37) Snyder, M.L.; Stewart, W.C.; and Kresse, J.I., 1981. Microtitration Neutralization Test for Pseudorabies and Transmissible Gastroenteritis Viruses. In: Serologic Mi-

- crotritation Techniques. USDA, APHIS, VS, NVSL, Ames, Iowa, pp. 44-48.
- (38) Stephano H., A.; Gay G., M.; Ramirez T., C.; Maqueda A., J., 1981. "Estudio de un brote de encefalitis en lechones por un virus hemaglutinante". Mem. de la XXII Convención AMVEC-IXTAPA 81. Del 1 al 5 de julio de 1981.
- (39) Stephano H., A.; Ramirez T., C.; Flores A., H., 1983. Situación actual del síndrome de encefalitis y opacidad de la córnea, conocido como "Ojo Azul". Mem. Congreso Nacional AMVEC, Pto. Vallarta, Jalisco. 29 de junio al 2 de julio, 1983.
- (40) Stephano H., A., 1983. Más sobre el Síndrome del ojo azul. Síntesis porcina Vol. 2, No. 6. junio, pp. 15-18.
- (41) Stephano H., A.; Gay G., M., 1983. El síndrome del "ojo azul" estudio experimental. Reunión de Investigación Pecuaria en México 1983. pp. 523-528.
- (42) Stephano H., A.; Rodriguez H.; Peralta R., C., 1984. Análisis de un brote de Angiopatía cerebro espinal (Enfermedad del Edema) y Síndrome del Ojo Azul en cerdos de una granja engordadora. II Congreso Nacional AMVEC, Mazatlán, Sin. julio 11 al 14 de 1984. pp. 102-104.
- (43) Stephano H., A.; Gay G., M., 1984. "Efecto de virus del ojo azul en la reproducción de la cerda". Mem. II Congreso Nacional AMVEC. Mazatlán, Sinaloa. Julio 11 al 14 de 1984. pp. 83-85.
- (44) Stephano H., A.; Gay G., M., 1984. Experimental studies on a new viral syndrome in pigs called "blue eye", characterized by encephalitis and corneal opacity. Proc. of the International Pig Veterinary Society, 8th Congress, Ghent, Belgium, August 27-31, Chap. II, p. 71.

- (45) Stephano H., A.; Gay G., M., 1984. Síndrome del ojo azul en cerdos en México. Reunión de Investigación Pecuaria en México 1984. p. 138.
- (46) Stephano H., A., 1985. Brotes de encefalitis en cerdos de engorda. Síntesis porcina, Vol. 4, No. 2, febrero, 1985. pp. 9-12.
- (47) Stephano H., A.; Gay G., M., 1985. Síndrome del ojo azul en cerdos. Mem. Encuentro sobre Enfermedades Infecciosas del Cerdo. Editado por P. Correa G. y A. Morilla, AMVEC, Centro Médico Nacional del IMSS, México, D.F., 6 y 7 de mayo, 1985, pp. 1-13.
- (48) Stephano H., A.; Gay G., M., 1985. El síndrome del ojo azul en cerdos en granjas engordadoras. Mem. XX Reunión Nacional AMVEC, Mérida, Yucatán, 10-13 de julio, pp. 71-74.
- (49) Stephano H., A.; Gay G., M.; Kreese, J., 1986. Properties of a Paramixovirus associated to a new syndrome (blue eye syndrome) characterized by encephalitis, reproductive failure and corneal opacity. Proc. of the International Pig Veterinary Society, 9th Congress, July 15-18, 1986, Barcelona, Spain, p. 455.
- (50) Stephano, A.; Doperto J., M.; Gay, M., 1986. Estudio epidemiológico en 2 granjas afectadas por el Síndrome del Ojo Azul. Proc. of the International Pig Veterinary Society, 9th Congress, July 15-18, 1986, Barcelona, Spain, p. 456.
- (51) Stephano H., A.; Gay G., M., 1986. Encefalitis, trastornos reproductivos y opacidad de la córnea en cerdos (síndrome del ojo azul) asociados a un paramixovirus. Estudio Cronológico. Medicina Veterinaria. Vol. 3, No. 7-8, julio-agosto. pp. 359-362.

- (52) Stephano H., A.; Fuentes R., M.; Hernández J., P.; Herradora L., M.; Carreón, R., 1988. Encefalitis y opacidad de la córnea en cerdos destetados, inoculados experimentalmente con Paramyxovirus de ojo azul. Mem. XXIII Congreso Anual AMVEC, León, Guanajuato, julio 20-24 de 1988, pp. 90-92.