

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**EVALUACION DEL PODER INMUNOGENICO DE UNA
VACUNA CONTRA EL COLERA PORCINO, APLICADA
SIMULTANEAMENTE CON OMNADINA Y CON SUERO
HIPERINMUNE**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER
EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :
RAFAEL DE J. QUINTANA LOPEZ**

México, D. F.,

1970



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**EVALUACION DEL PODER INMUNOGENICO DE UNA
VACUNA CONTRA EL COLERA PORCINO, APLICADA
SIMULTANEAMENTE CON OMNADINA Y CON SUERO
HIPERINMUNE**

TESIS PROFESIONAL

RAFAEL DE J. QUINTANA LOPEZ

México, D. F.,

1970

A MI PADRE

A MI MADRE

A MIS HERMANOS

A MIS MAESTROS, COMPAÑEROS Y AMIGOS

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE INMUNOGE-
NETICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA,
SIENDO ASESORADO POR JUAN GARZA RAMOS, M.V.Z. M.Sc.

INDICE

	<u>PAG.</u>
CAPITULO I - INTRODUCCION	1
CAPITULO II - MATERIAL Y METODOS	14
CAPITULO III - RESULTADOS	26
CAPITULO IV - DISCUSION	33
CAPITULO V - SUMARIO Y CONCLUSIONES	38
CAPITULO VI - BIBLIOGRAFIA	40

CAPITULO I

INTRODUCCION

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (F.A.O.), estima que la población porcina mundial asciende a 485 millones de cerdos. (40)

La población porcina de los Estados Unidos Mexicanos, según el dato que arrojó el censo de 1960 fué de 5,852.323 cabezas (11 y 12), y la cifra estimativa en 1969 fué de 10,206.698. (44)

Hasta el año de 1967 se juzgaba que la población humana en México consumía alrededor de 3.5 Kgs. de carne de cerdo per capita al año, (10 grs. diarios). (40)

Si las enfermedades porcinas pudieran controlarse y llegar a erradicarse, el costo de producción se reduciría considerablemente, pudiendo en caso deseado aumentarse la población de cerdos con mucha mayor rapidez. En México, con uno de los más altos índices de natalidad del mundo, con aumento constante de poder adquisitivo entre sus habitantes que determinan una mayor demanda de carne, y dadas las costumbres y hábitos de nuestro pueblo, el aumento en carne de cerdo es de los más altos comparativamente con la de otras especies animales.

La mortalidad por cólera porcino en México, de acuerdo con un cálculo muy conservador es de un 2 a un 5 %, y la morbilidad de aproximadamente un 15 %. (28)

El cólera porcino es indiscutiblemente la enfermedad infecciosa que mayores problemas ocasiona a los criadores y sin lugar a dudas, la más importante por la frecuencia de su presentación, lo que en términos de pérdida económica se traduce en millones de pesos.

La distribución mundial de la enfermedad en 83 países de Africa, -- Europa, Medio Oriente, América y Oceanía, fué reportada por la --- F.A.O: (30)

En 46 países no hay datos ó está erradicada.

En 18 países es esporádica.

En 19 países es enzootica.

La erradicación del cólera en los cerdos en México podría lograrse aproximadamente en 6 años. Este programa abarcaría 4 etapas principales.

Las 2 primeras estarían enfocadas a lograr un control para disminuir la incidencia.

Las otras 2 etapas serían para otorgar facilidades para pagos de indemnización, que es el paso necesario para la erradicación. (10)

Hay sustancias que inyectadas junto con un antígeno favorecen la estimulación de una respuesta inmune más enérgica que la que se obtendría con el antígeno solo. Estas sustancias son llamadas adyuvantes y se han empleado en Inmunología experimental e Inmunología clínica para potencializar el efecto de algunos antígenos.

Poco puede decirse actualmente sobre el mecanismo íntimo de la acción de los adyuvantes, pero aparentemente el efecto adyuvante es debido al retraso en la absorción del antígeno resultado de la reacción inflamatoria que aparece en el sitio de inyección de la mezcla antígeno-adyuvante. Además, la administración de adyuvantes produce un aumento en la capacidad fagocítica e hiperplasia de las células del sistema retículo-endotelial (35) que también explicaría el efecto de estas sustancias.

Dentro de los adyuvantes está la Ommadina que es un producto compuesto por proteínas lipoides de origen biliar y grasas animales.

La composición por cada 100 ml. es la siguiente:

	proteína	7.00 mg.
	grasas	1.20 mg.
(1)	lipoides	6.00 mg.
(2)	sales biliares . . .	25.00 mg.

(1) suma de los fosfolipoides y de la colessterina

(2) declaradas como ácido fólico

Se ha empleado la Omnadina en la llamada "protefno-terapia inespecfica", pues se ha encontrado que esta sustancia estimula los mecanismos de defensa del organismo.

La resistencia de un organismo a sustancias extrañas puede ser de:

A) tipo inespecífico

B) tipo específico

A) Los mecanismos de defensa inespecífico forman parte de la inmunidad natural y están representados por las llamadas barreras y por factores propios del huésped como pueden ser, la edad, nutrición, - etc. Entre los factores responsables de esta resistencia inespecífica resaltan sustancias bactericidas que se localizan en fluidos y tejidos y/o en la sangre. Dentro de éstos, quizá las más importantes sean la lizosima, el sistema properdina, la inmunoconglutinina, etc.

B) La resistencia de tipo específico es debida a la respuesta del sistema inmunocompetente a sustancias extrañas al organismo. La respuesta inmune puede manifestarse en forma humoral cuando hay producción de anticuerpos específicos al antígeno que motivó su producción, y/o por una respuesta celular que puede ser inmunidad celular o hipersensibilidad celular.

Bieling y Brauer (1937) (2), inyectaron ratones con Brucella abortus por vía intraperitoneal, los cuales murieron a los pocos días; en cambio, en el grupo que después de la inoculación se les inyectó Omnadina, el curso de la enfermedad fué mucho más prolongado, lo -- que pudiera interpretarse como que la Omnadina aumentó las defensas naturales.

Bajo la influencia de este producto, hay una proliferación general de los elementos del sistema retículo-endotelial, que incluye entre otras a las células reticulares del Bazo, médula ósea, tejido linfoide, las células de Kupffer del hígado, etc. Funcionalmente se ha definido a este grupo de células como aquellas capaces de fagocitar detritus celulares y otras partículas.

Después de la aplicación de Omnadina, una gran parte de las células endoteliales se desprenden y llegan a la sangre donde aparecen como células mononucleares grandes ó macrófagos (16). Donde éstas se -- desprendieron, aparecen posteriormente elementos jóvenes útiles para la fagocitosis. (25)

Esta reacción explica el hecho de que en el experimento de Bieling y Brauer, después de la aplicación de la Omnadina el organismo aumentó su poder para fagocitar elementos extraños.

El aumento del número de fagocitos producidos tras la inyección de Omnadina, tiene importancia no solamente por el aumento de la fago-

citosis que representa, sino por ser reflejo de la estimulación de todo el sistema retículo-endotelial, que también incluye un aumento de los niveles de gamma globulina en el plasma.

Pocos datos se conocen de la Omnadina en relación a las vacunaciones.

En un Experimento de Bieling y Brauer (2), a los animales que se les aplicó una vacuna hecha de neumococos, resistieron una inyección por vía intravenosa de 1 ml. de un cultivo 1:100 000 sin enfermarse; mientras que conejos no inmunizados murieron 1-2 días después de la inyección intravenosa del mismo cultivo. La inmunidad adquirida permaneció activa durante varias semanas, desapareciendo paulatinamente durante los siguientes tres meses.

Después de este tiempo, la inmunidad no era suficientemente alta como para evitar las consecuencias letales del cultivo diluido, 1:100 000.

La inyección de 2 ml. de Omnadina provocó que la inmunidad disminuida aumentara su nivel. En los conejos así tratados, la inyección de la dosis infectante fué resistida, mientras que los animales inmunizados hacía tiempo y no tratados con Omnadina, murieron pocos días después de la inoculación.

Por lo anteriormente citado, puede deducirse que la Omnadina produce en animales que fueron vacunados y en los que con el transcurso del tiempo ha disminuído su resistencia, un aumento en sus niveles de inmunidad.

El estímulo inespecífico de la Omnadina, provoca en el individuo -- aparentemente una respuesta secundaria ó anamnésica hacia aquellos antígenos contra los que había desarrollado inmunidad activa. (2)

El mecanismo de acción de este fenómeno producido por la Omnadina - se desconoce. Las respuestas anamnésicas clásicas que pueden ser - de tipo humoral o celular, son producidas por una segunda estimulación del mismo antígeno. Estas respuestas secundarias consisten en una reactividad exagerada hacia el antígeno responsable y se caracterizan por un período de latencia más corto que el primario y por alcanzar un título mayor de anticuerpos cuyas características físico-químicas pueden ser diferentes a las de los elaborados en la respuesta primaria.

Los anticuerpos actúan neutralizando al antígeno y especialmente facilitando su fagocitosis.

Una vez fagocitado el antígeno, su eliminación depende de la respuesta inmune celular. (35)

En los animales superiores, el funcionamiento eficaz del sistema inmunológico depende de la interacción de los factores celulares y humorales con el material introducido. (32)

INMUNOPROFILAXIS AL COLERA PORCINO.

Inmunidad natural.- Los lechones hijos de madres inmunes al virus - del cólera porcino, tienen inmunidad adquirida naturalmente en forma pasiva que les dura hasta aproximadamente 6 semanas de edad. Los individuos que padecen enfermedad adquieren inmunidad naturalmente en forma activa.

Inmunidad artificial pasiva.- Se puede adquirir inmunidad artificialmente en forma pasiva aplicando suero hiperinmune. la duración de la resistencia conferida por este método es de unos cuantos días. Su ventaja es que proporciona inmunidad aproximadamente a las 3 horas de aplicado.

Inmunidad artificial activa.- Esta puede obtenerse con los siguientes métodos:

- 1.- Virus virulento-Suero hiperinmune.
- 2.- Virus inactivado.
- 3.- Virus inactivado-Suero hiperinmune.
- 4.- Virus atenuado.- Este grupo de vacunas se elabora con virus que han perdido parcialmente su virulencia, pero que conservan su poder antigénico. Estos virus atenuados conservan su capacidad de reproducirse dentro de las células del huésped, logrando esto, que la estimulación del sistema inmunocompetente se lleve a cabo por un alto número de partículas antigénicas.
 - a) Vacunas de virus lapinizado.- Se elabora con virus atenuado por pases en conejo.

- b). Otra vacuna de virus atenuado se elabora a partir de tejidos de cerdo que han sido inoculados con una cepa atenuada del virus del cerdo.
- c) Vacuna de origen de cultivo de tejido.- Se elabora con virus atenuado por pases en serie en cultivo monovalente en células de riñón de embriones de cerdo.

Esta última vacuna es segura, especialmente porque al ser elaborada en cultivo de tejido, descarta la posibilidad de inocular junto con la vacuna, agentes extraños.

Las vacunas de origen de cultivo de tejido tienen la ventaja de contener además del antígeno que representa el virus del cólera porcino, otros pocos antígenos. Por el contrario, las otras vacunas están elaboradas en tal forma que contienen un alto número de antígenos, además del virus del cólera. Este aspecto es muy importante pues es sabido que de la administración simultánea de dos ó más antígenos, resulta una respuesta inmune deficiente para uno de ellos. Este fenómeno conocido con el nombre de "Competencia de Antígeno", aparentemente se realiza a nivel de elección de las células vírgenes capaces de ser estimuladas por un antígeno. (35). La posibilidad de que se presente un choque anafiláctico es más baja empleando estas vacunas.

Este grupo de vacunas de virus atenuado, son las que se emplean actualmente en mayor escala. Cuando son manejadas y aplicadas correctamente, estas vacunas producen una inmunidad satisfactoria.

- 5.- Virus atenuado-Suero hiperinmune.- Se ha empleado la aplicación simultánea de virus atenuado-suero hiperinmune, porque produce inmunidad inmediata.

Ocasionalmente, la administración del antígeno junto con su anticuerpo específico como ocurre en este caso, determina modificaciones importantes en la respuesta inmune. Se obtiene acción adyuvante cuando la relación antígeno-anticuerpo favorece al antígeno. Por el contrario, si el antígeno está en equivalencia con el anticuerpo, se nulifica totalmente el estímulo antigénico.(35)

Por este motivo es de suma importancia no alterar las dosis de suero hiperinmune recomendadas por la literatura, con el objeto de no perder la oportunidad de obtener el efecto adyuvante anteriormente citado.

Dunne (8) demostró que si a un animal se le aplica una dosis determinada de suero hiperinmune y posteriormente una dosis de vacuna, ó una vacunación simultánea con suero hiperinmune, inclusive 19 días después de la aplicación del suero, hay un efecto de "bloqueo". Como este fenómeno impide la correcta respuesta del individuo a la vacunación, es necesario hacer la aplicación de suero bajo condiciones estrictamente necesarias.

MEDICION DE LA INMUNIDAD AL COLERA PORCINO.

La iniciación de los métodos serológicos fué descrita por Bordet en 1885 con su clásico trabajo sobre las propiedades del suero inmune de animales inmunizados, y por Von Behring en 1890 con sus observaciones sobre la neutralización de exotoxinas del suero de animales inyectados con dosis repetidas de toxinas.

Kwapinski (21) y Kabat y Mayer (18), han descrito los mecanismos de todas las pruebas serológicas desarrolladas a la fecha.

Se han hecho estudios serológicos in-vitro para detectar virus del cólera porcino empleando antisueros potentes. Dentro de estos estudios resaltan los de Segre (39) que empleó la prueba de Hemaglutinación Pasiva; los de Mengeling y Torrey (26) y Lin, Shimizu, Kumagai, y Sasahara (23) entre otros, empleando la prueba de Inmunofluorescencia; Kumagai, Shimizu, Ikeda y Matsumoto (20) detectaron y titularon el virus de cólera del cerdo y sus anticuerpos por el efecto del virus del cólera sobre el virus de la enfermedad del Newcastle en cultivo de tejido de suinos. Coggings y Col. (4) desarrollaron la prueba de Neutralización, también con el mismo propósito. Alvarez (1) empleó la prueba de Inmunodifusión para estudiar diferencias antigénicas entre cepas del cólera porcino.

Para cuantificar anticuerpos formados consecutivamente a la inmunización, se ha empleado la técnica de Conglutinación de Complemento Conglutinante por Milliam y Englehard (27) y Tellez Girón (42).

Sin embargo, ninguno de estos métodos in-vitro, ha permitido realizar un estudio inmunológico consecutivo a la inoculación de animales con virus del cólera del cerdo.

La respuesta inmunológica humoral consecutiva a la vacunación, se ha estudiado en forma inespecífica haciendo la electroforesis del suero de los animales antes y después de vacunados midiendo los niveles de gamma globulina. (Poul(37) y Weide y King(45))

Por la falta de métodos serológicos adecuados para aplicarlos en el control y erradicación de esta enfermedad, es necesario hacer los estudios sobre la inmunidad al cólera del cerdo in-vivo.

A causa de que los animales comunes de laboratorio no se pueden emplear para el estudio del virus del cólera porcino, las apreciaciones sobre el desarrollo, grado y duración de la inmunidad originados por los agentes inmunizantes, dependen casi exclusivamente del empleo de cerdos susceptibles a la infección natural ó experimental (42):

En los estudios de campo, la protección conferida por las vacunas solo puede ser apreciada a través de comparaciones estadísticas de la morbilidad y mortalidad específica entre la población vacunada y la no tratada; por lo que para probar el grado y duración de la resistencia, se adquieren animales que son expuestos a virus virulento en locales acondicionados para estas pruebas.

La cepa de virus utilizada para determinar la potencia de la vacuna, es la que según Langer (22) está ordenada en el grupo uno, ó sea de las designadas "virus industriales" cuya elevada virulencia se ha mantenido por largo tiempo por pases consecutivos en cerdos para emplearse como virus de exposición en pruebas de potencia.

Tomando en consideración los problemas que existen con los métodos vigentes de inmunización contra el cólera porcino, se realizó el presente trabajo que evalúa el efecto inmunogénico de una vacuna de virus atenuado de origen de cultivo de tejido aplicada simultáneamente con suero hiperinmune anticolérico y el efecto de la misma vacuna aplicada conjuntamente con ommadina con el propósito de encontrar un método práctico y económico.

CAPITULO I I

MATERIAL Y METODOS

Este trabajo fué llevado a cabo en dos etapas:

- A) Pruebas in-vivo
- B) Pruebas in-vitro

Las pruebas in-vivo se desarrollaron en la Granja Porcina del --- Sr. Guillermo Gosserez, en Cuautla, Mor., y en los corrales de Química Hoechst de México, S.A.; en tanto que las pruebas in-vitro se llevaron a cabo en el Laboratorio de Inmunogenética del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

A) PRUEBAS IN VIVO.-

El objeto de las pruebas in-vivo fué:

Evaluar la inmunogenicidad conferida por la aplicación simultánea - de vacuna-suero hiperinmune y vacuna-ommadina como finalidad principal. Además se emplearon estas pruebas para probar la virulencia - de un inóculo y para su titulación.

En la primera etapa se utilizaron 76 cerdos 'Duroc Jersey', distribuyéndose en 4 grupos:

- I.- 54 cerdos para la vacunación.
- II.- 2 animales para comprobar la virulencia de una muestra de sangre obtenida de un cerdo con cólera.
- III.- 20 individuos para la titulación del virus contenido en dicha muestra.
- IV.- 6 cerdos del grupo I para el desafío.

Los animales empleados no recibieron ningún producto biológico y se seleccionaron con peso que oscilara entre 10-20 Kgs. cada uno a las 8 semanas de edad.

Desde el nacimiento hasta la octava semana en que se comenzó la prueba se hicieron revisiones clínicas periódicas a cada uno de los animales, (incluyendo temperatura); habiéndose observado un estado aparente de salud.

En la séptima semana de edad, se dió a los cerdos Piperazina base en solución acuosa a razón de 1 ml./ Kg.

GRUPO I .-

54 cerdos fueron vacunados en dos lotes de 27 individuos cada uno. El lote I se empleó para probar la acción del suero hiperimmune anticolérico (Suero contra el cólera porcino*) aplicado junto con Vacuna de cultivo de tejido contra el cólera porcino (**). El lote II se empleó para probar la aplicación simultánea de omnadina (***) y la misma vacuna.

(*) Suero contra el cólera porcino^R. - Química Hoechst de México, S.A.

(**) Porcivac^R. - Química Hoechst de México, S.A.

(***) Omnamune^R. - Química Hoechst de México, S.A.

El lote I fué subdividido en 3 sublotes:

Sublote I a) 9 cerdos entre 7 y 10 Kgs. de peso, aplicándoseles -
10 ml. de suero hiperinmune anticolérico y 1 dosis -
de vacuna (2 ml.)

Sublote I b) 9 cerdos entre 11 y 15 Kgs. de peso, aplicándoseles
15 ml. de suero hiperinmune anticolérico y 1 dosis -
de vacuna (2 ml.)

Sublote I c) 9 cerdos entre 16 y 22 Kgs. de peso, aplicándoseles
30 ml. de suero hiperinmune anticolérico y 1 dosis -
de vacuna (2 ml.)

El lote II fue subdividido igualmente en 3 sublotes:

Sublote II a) 9 cerdos entre 5 y 8 Kgs. de peso, aplicándoseles --
10 ml. de omnadina y 1 dosis de vacuna (2 ml.)

Sublote II b) 9 cerdos entre 9 y 12 Kgs. de peso, aplicándoseles -
15 ml. de omnadina y 1 dosis de vacuna (2 ml.)

Sublote II c) 9 cerdos entre 14 y 18 Kgs. de peso, aplicándoseles
30 ml. de omnadina y 1 dosis de vacuna (2 ml.)

Los cerdos de todos los lotes fueron observados durante los tres -- días siguientes a la vacunación, se les tomó la temperatura y se observaron posibles reacciones; solamente un cerdo del Sublote I b) - presentó elevación de temperatura (40.5°), atribuída a una infección cutánea que cedió al tratamiento con nitrofuranos.

Posteriormente se hicieron revisiones cada tercer día hasta los 56 días.

A las ocho semanas después de vacunados (56 días), se les extrajo - de la vena auricular de la oreja, 5 ml. de sangre, colocándose en - frascos estériles que se conservaron en refrigeración durante la noche.

A las 16 horas se separó el suero, centrifugándolo posteriormente a 1500 r.p.m. durante 10 minutos y colocándolo en frascos estériles a -20°C hasta su uso.

GRUPO II.-

Se probó la virulencia de una muestra de sangre, empleando dos cerdos susceptibles. Estos fueron mantenidos en dos corraletas, aplicándoseles 2 ml. de sangre colérica. Se les tomó temperatura diaria, anotándose los síntomas hasta su muerte.

GRUPO III.-

Para conocer la dosis mínima letal que se usó en el desafío de los cerdos vacunados, se hizo la titulación del virus contenido en la sangre colérica in-vivo.

Se usaron 20 cerdos con peso aproximado de 20 Kgs.

Posteriormente se formaron 7 lotes, a los que se les aplicaron diferentes diluciones del virus como indica la Tabla I.

Las diluciones de este virus fueron hechas basándose en el dato de que 2 ml. contienen 20,000 dosis letales aproximadamente.

TABLA I.-

a 2 cerdos		se les aplicó 2 ml. a c/u = 20,000 D.
a 3 cerdos de la dilución 10^{-1}		se les aplicó 2 ml. a c/u = 2,000 D.
a 3 cerdos " " "	10^{-2}	" " " 2 ml. a c/u = 200 D.
a 3 cerdos " " "	10^{-2}	" " " .5 ml. a c/u = 50 D.
a 3 cerdos " " "	10^{-3}	" " " 1 ml. a c/u = 10 D.
a 3 cerdos " " "	10^{-3}	" " " .5 ml. a c/u = 5 D.
a 3 cerdos " " "	10^{-4}	" " " 1 ml. a c/u = 1 D.

Cada lote de tres animales estaba en corraletas separadas, habiéndose realizado la limpieza y la alimentación, primero los cerdos inoculados con las diluciones más altas y al último con las más bajas. En cada entrada se colocó un tapete con compuesto cuaternario de amonio.

GRUPO IV. -

A los 68 días después de vacunados los cerdos, se tomaron del grupo I seis animales: tres del sub lote I c) con la máxima cantidad de suero hiperimmune anticolérico y tres del sub lote II c) con la máxima cantidad de omnadina; se hizo así por suponerse que a mayor cantidad de suero se neutralizaba el efecto inmunogénico de la vacuna y que, con la omnadina, éste se potencializaba.

A estos cerdos se les aplicó 2 ml. de sangre colérica para exponerlos, observándose durante 15 días curvas termométricas y síntomas en cada uno de ellos.

B) PRUEBAS IN VITRO. -

En la segunda etapa, o sea la etapa in-vitro se hicieron las siguientes pruebas con el objeto de tratar de encontrar una técnica que permitiera titular los anticuerpos anticólera en los sueros de animales vacunados:

- a.- Hemaglutinación pasiva
- b.- Microinmunodifusión en placa
- c.- Electroforesis en acetato de celulosa y densitometría
- d.- Cromatografía de vacuna y sangre colérica para obtener virus purificado.

a.- HEMAGLUTINACION PASIVA.-

Esta prueba hecha para intentar cuantificar los anticuerpos contra el virus del cólera porcino, se llevó a cabo de acuerdo con el método de Boyden (3) y Takahashi (41).

Se empleó:

- 1.- Solución fisiológica bufferada con pH 7.2
- 2.- Acido Tánico al 5% conservado un máximo de 7 días a 4°C; el ácido tánico es diluido 1:15 000 con solución salina para el tratamiento de los glóbulos rojos.
- 3.- Diluyente: Los glóbulos rojos que fueron tratados con ácido tánico son inestables en solución salina y por lo tanto fueron suspendidos en una dilución 1:200 de suero normal de conejo.
- 4.- Glóbulos rojos de borrego lavados tres veces antes de su empleo.
- 5.- Como antígeno se empleó vacuna restituida y sangre colérica diluída 1:4; posteriormente se usaron los virus purificados.- (véase d.-)
- 6.- Sueros de cerdos vacunados.

Los cerdos fueron sangrados de la vena auricular 68 días después de la vacunación; el suero separado naturalmente se centrifugó y se depositó en ampolletas, se inactivó en baño de maría a 58°C durante 30 minutos y se puso en congelación para su almacenamiento a -20°C hasta su empleo.

Los sueros porcinos normales fueron obtenidos sangrando ascépticamente 4 cerdos de 10 semanas de edad que no habían sido vacunados contra el cólera porcino. Los sueros fueron separados y almacenados de la misma manera que los anteriores.

Para obtener los glóbulos rojos de borrego, el sangrado fué hecho por punción de la vena yugular previa depilación de la zona cervical inferior y lavado con alcohol, y se depositó la sangre en equipo Vacutainer** estéril con solución de Alsever's (21) como anticoagulante.

A esta prueba se le hicieron variantes con las lecturas a determinadas horas; por otro lado, la solución protéica ó sea el suero normal de conejo, se sustituyó por albúmina bovina cristalizada, por creer que la anterior aglutinaba sola los glóbulos rojos de ovino.

** Becton Dickinson de México, S. A.

b.- MICROINMUNODIFUSION EN PLACA.

La técnica serológica de inmunodifusión ha resultado ser una prueba analítica de gran especificidad, resolución y simplicidad.

Los resultados son visibles, comparables y reproducibles, y pueden ser observados por largos períodos sin cambios.

La prueba de inmunodifusión se hizo sobre portaobjetos con agar. Esta técnica fué introducida por Ouchterlony (34) y es aplicable para estudiar antígenos ó anticuerpos y para su clasificación e identificación.

Los pasos a seguir en esta técnica, fueron los descritos en en manual Gelman para inmunodifusión. (13)

A los portaobjetos con agar, se le hicieron 5 perforaciones formando una cruz, con una perforación en la intersección. Entre las perforaciones se guardó un espacio de 0.5 cms.

En la perforación central se colocó el antígeno (vacuna ó sangre) y en las perforaciones de la periferia, los sueros problema. A las 24 horas se hizo una segunda colocación de sueros en los portaobjetos y posteriormente fueron lavados, secados, teñidos, lavados, secados y observados.

Con el objeto de facilitar la unión antígeno anticuerpo, en algunos portaobjetos con agar se les hicieron en pruebas subsecuentes las perforaciones a diferentes distancias, empezando por 2.5 cms. entre perforación y perforación; luego 2 cms., 1.5 cms., 1 cms. y 1/2 cm. Además, en algunas laminillas se hizo hasta una tercera colocación de sueros.

c.- ELECTROFORESIS EN ACETATO DE CELULOSA Y DENSITOMETRIA.-

Esta prueba se hizo para medir el porcentaje de las fracciones proteicas de los sueros de los cerdos vacunados con suero hiperimmune y en los cerdos vacunados con Ommadina.

La Técnica se realizó siguiendo el método descrito por Gelman (14) con las siguientes modificaciones:

Se empleó buffer Tris-barbital-barbital sódico "Gelman" con pH 8.8. diluido 1:1

Se aplicó durante el tiempo de electroforesis 1 ma. por tira durante 40 minutos.

Las tiras de acetato de celulosa fueron posteriormente teñidas con Ponceau S, lavadas y clarificadas.

Una vez clarificadas las tiras, se hizo un análisis cuantitativo -- por densitometría con el objeto de determinar los porcentajes de -- los diferentes grupos de proteínas existentes en el suero (albumina y alfa, beta y gamma globulina). Este análisis se hizo empleando - equipo Analytrol (Beckman Instruments, Co.) y se siguió el procedimiento descrito por Gelman (14) empleando el adaptador Scan-A-Tron (Gelman Instrument, Co.).

En las gráficas obtenidas en papel milimétrico especial, se midió el área comprendida dentro de las curvas correspondientes a albumina y alfa, beta y gamma globulinas y se registró el porcentaje.

d.- CROMATOGRAFIA DE VACUNAS Y SANGRE COLERICA PARA OBTENER EL VIRUS LIBRE DE OTRAS SUBSTANCIAS.

Tratando de obtener una mejor especificidad en las pruebas de hemaglutinación pasiva y microinmunodifusión, se pasaron las muestras de antígeno por una columna de Sepharose 4B (Pharmacia, Uppsala, Suecia) en buffer Tris-HCl pH 7.5 . Se empleó un colector de fracciones Ultrarac (LKB, Estocolmo Suecia) y se registró el paso de ácidos nucleicos en el líquido después de pasar por la columna empleando un absorciómetro de luz ultravioleta (256 m μ) y un registrador.

Del primer pico de ácidos nucleicos que teóricamente debería comprender a la fracción con virus purificado, se tomó una pequeña muestra que fué observada en el Laboratorio de Microscopía Electrónica del Departamento de Microbiología, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, para comprobar si efectivamente contenía virus.

BIBLIOTECA CENTRAL
U. N. A. M.

CAPITULO III

RESULTADOS

A) LOS RESULTADOS OBTENIDOS IN-VIVO FUERON:GRUPO I.-

Las reacciones post-vacunales en los animales vacunados, tanto con suero hiperinmune como con ommadina fueron normales en estos casos.

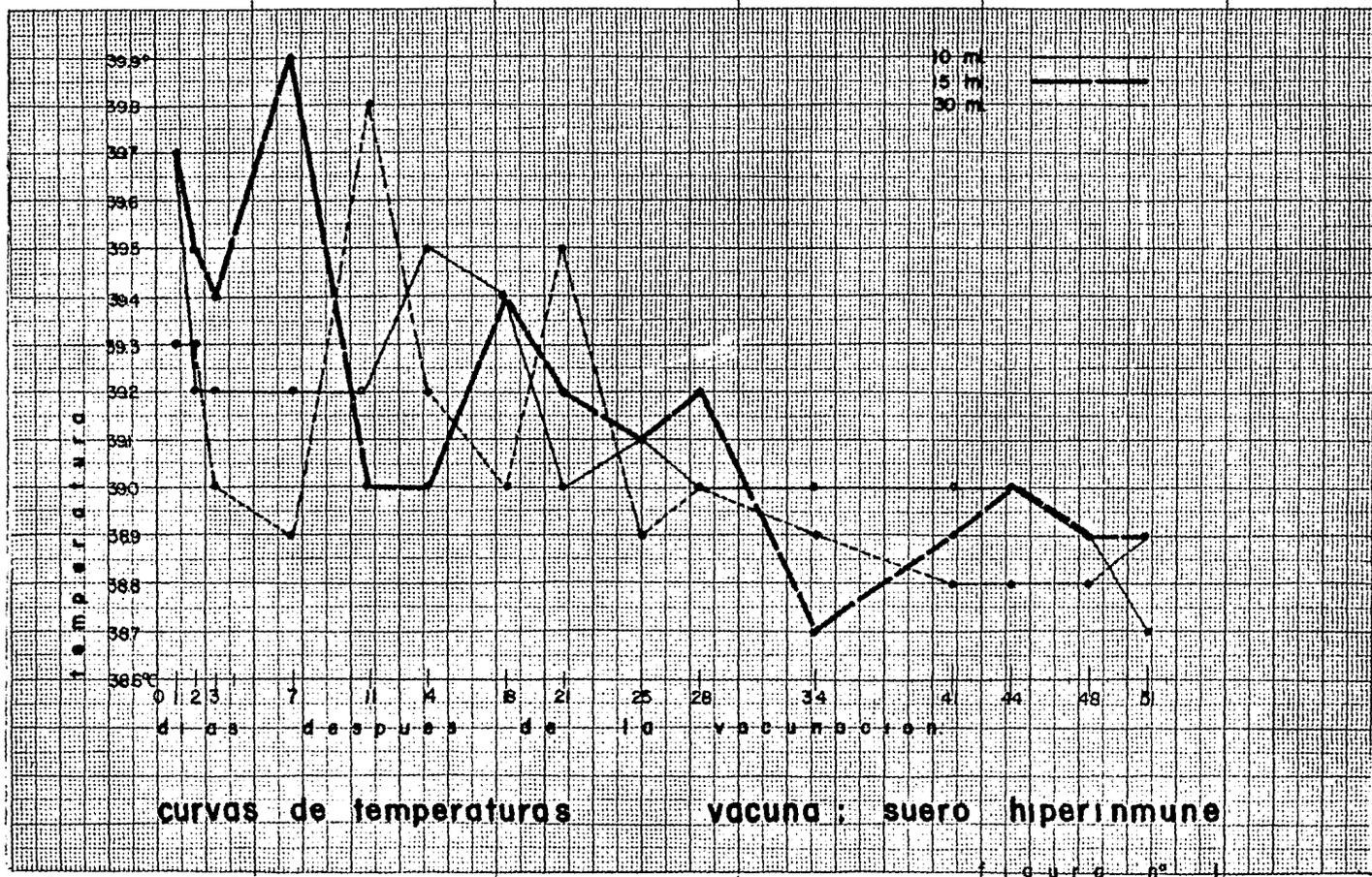
La figura No. 1 indica la gráfica de temperatura obtenida en los cerdos que recibieron vacuna-suero hiperinmune, y la figura No. 2, la de los cerdos que recibieron vacuna-omnadina.

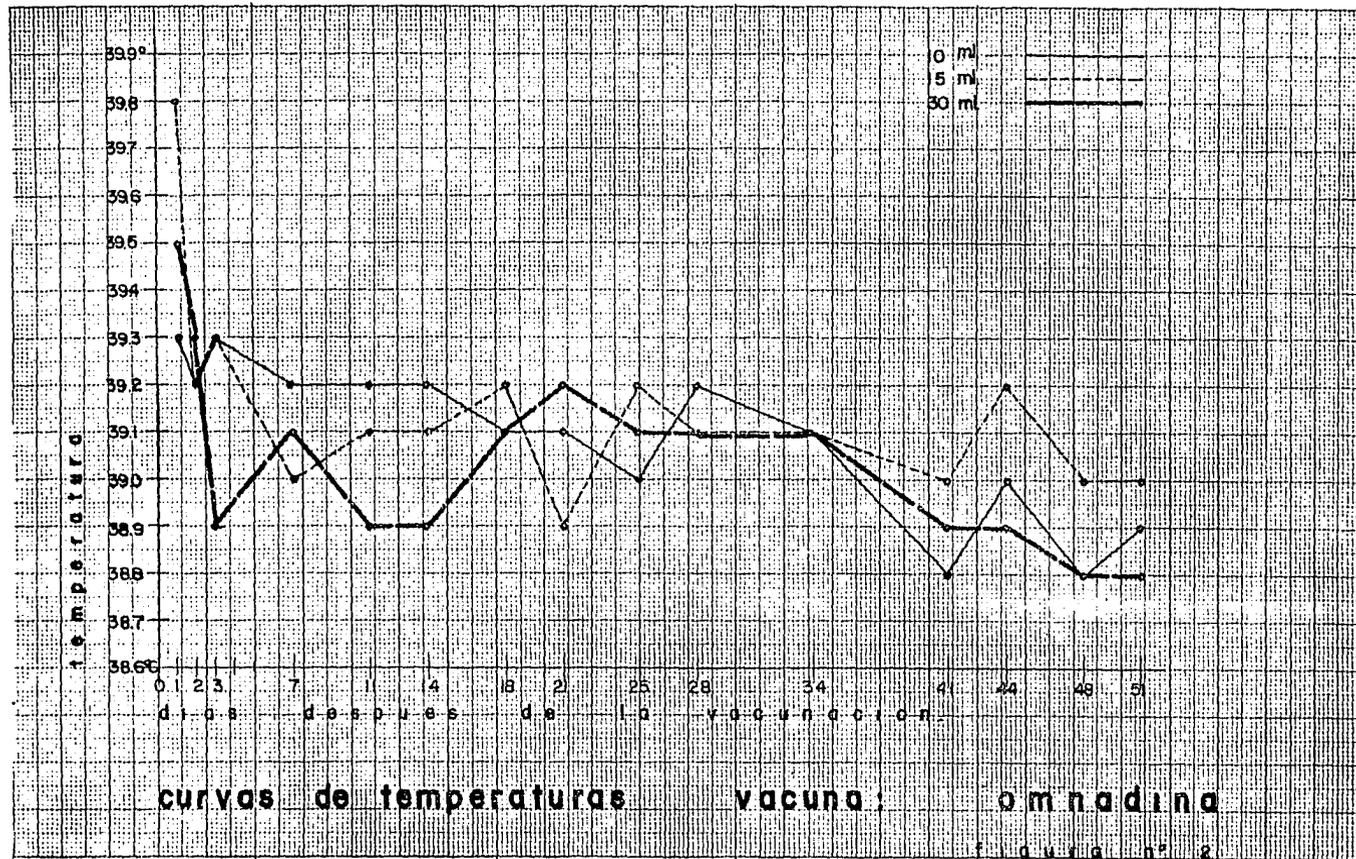
GRUPO II.-

Los dos cerdos inoculados con la sangre colérica fallecieron al 5° y 6° día respectivamente. La tabla II muestra las temperaturas registradas y síntomas observados en estos individuos posteriormente a la inoculación.

TABLA II

	<u>TEMPERATURA:</u>		<u>SINTOMAS:</u>
	<u>CASO 1</u>	<u>CASO 2</u>	
1er día	40.0°C	40.1°C	Decaimiento y fiebre.
2o. día	40.3°C	40.2°C	Decaimiento, inapetencia y fiebre.
3er día	40.5°C	40.5°C	Stress marcado, diarrea.
4o. día	40.6°C	40.5°C	Diarrea con heces blancuecinas y fiebre.
5o. día	38.5°C	40.6°C	Muerte del caso 1
6o. día		38.7°C	muerte del caso 2





Estos resultados demostraron que la sangre colérica tenía el suficiente poder vírico para hacer las titulaciones y posteriormente el desaffo.

GRUPO III.-

En las inoculaciones hechas para titular el virus, los animales murieron con diferencia de 5 días, incluyendo los inoculados con la dilución 10^{-4} ; los registros de temperaturas, síntomas y muertes se encuentran en la figura No. 3 y en la tabla III.

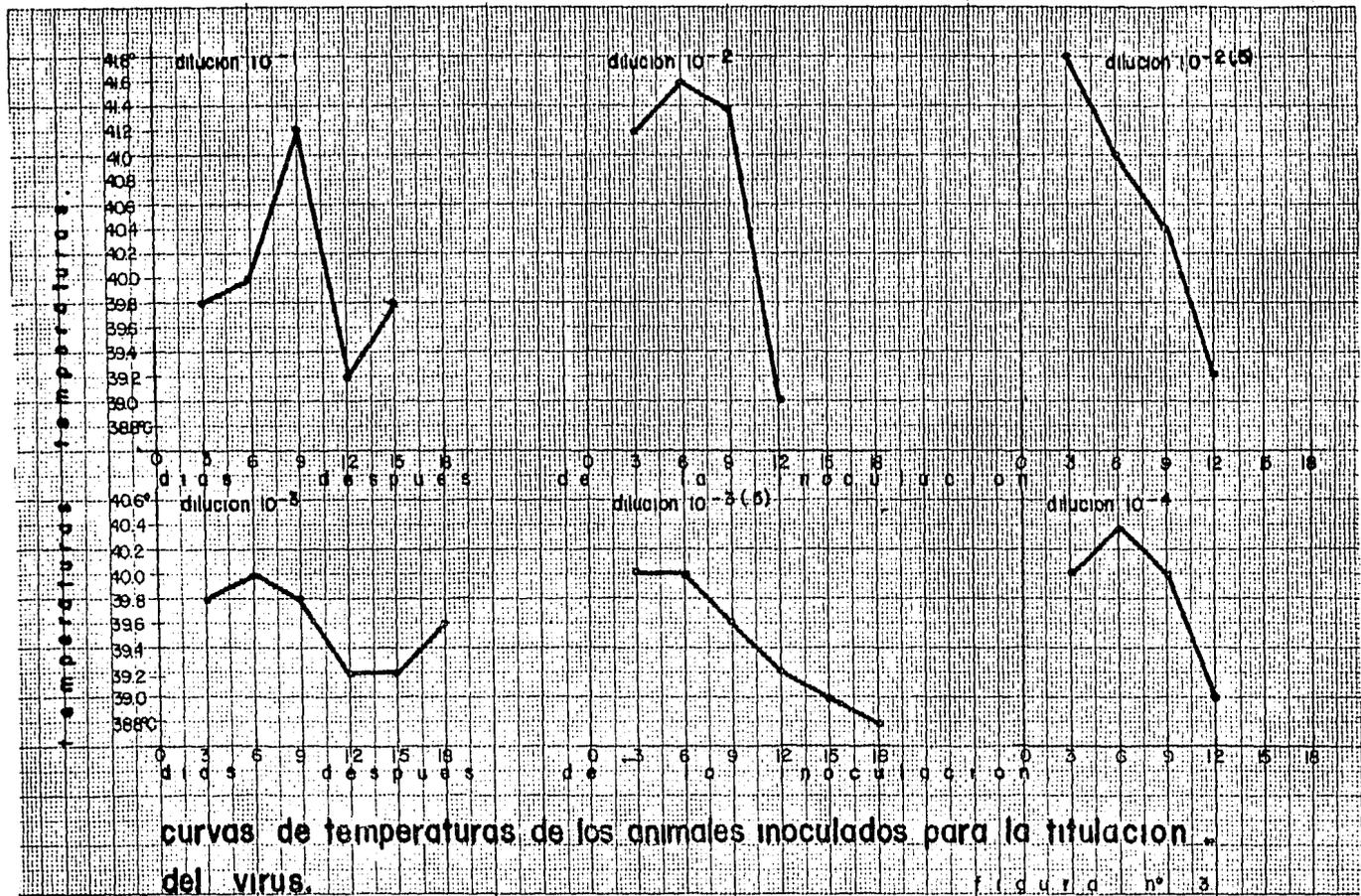
GRUPO IV.-

En la etapa del desaffo, los síntomas observados fueron; inapetencia y decaimiento, y se presentaron en forma similar tanto en el lote de animales que recibieron vacuna-omnadina, como los del lote que habían recibido vacuna-suero hiperinmune, diferenciándose solo por décimas de grado en la curva de temperatura como se muestra en la figura No. 4

B) RESUMEN DE RESULTADOS DE LAS PRUEBAS IN-VITRO:

a) Hemaglutinación Pasiva.- En hemaglutinación Pasiva, los 56 sueros, positivos y negativos no pudieron ser titulados debido a que todos aglutinaban aún en diluciones $1/3442880$, incluyendo los sueros controles.

Posteriormente se ensayó junto con los sueros de los cerdos, un con



curvas de temperaturas de los animales inoculados para la titulación del virus.

figura n° 3

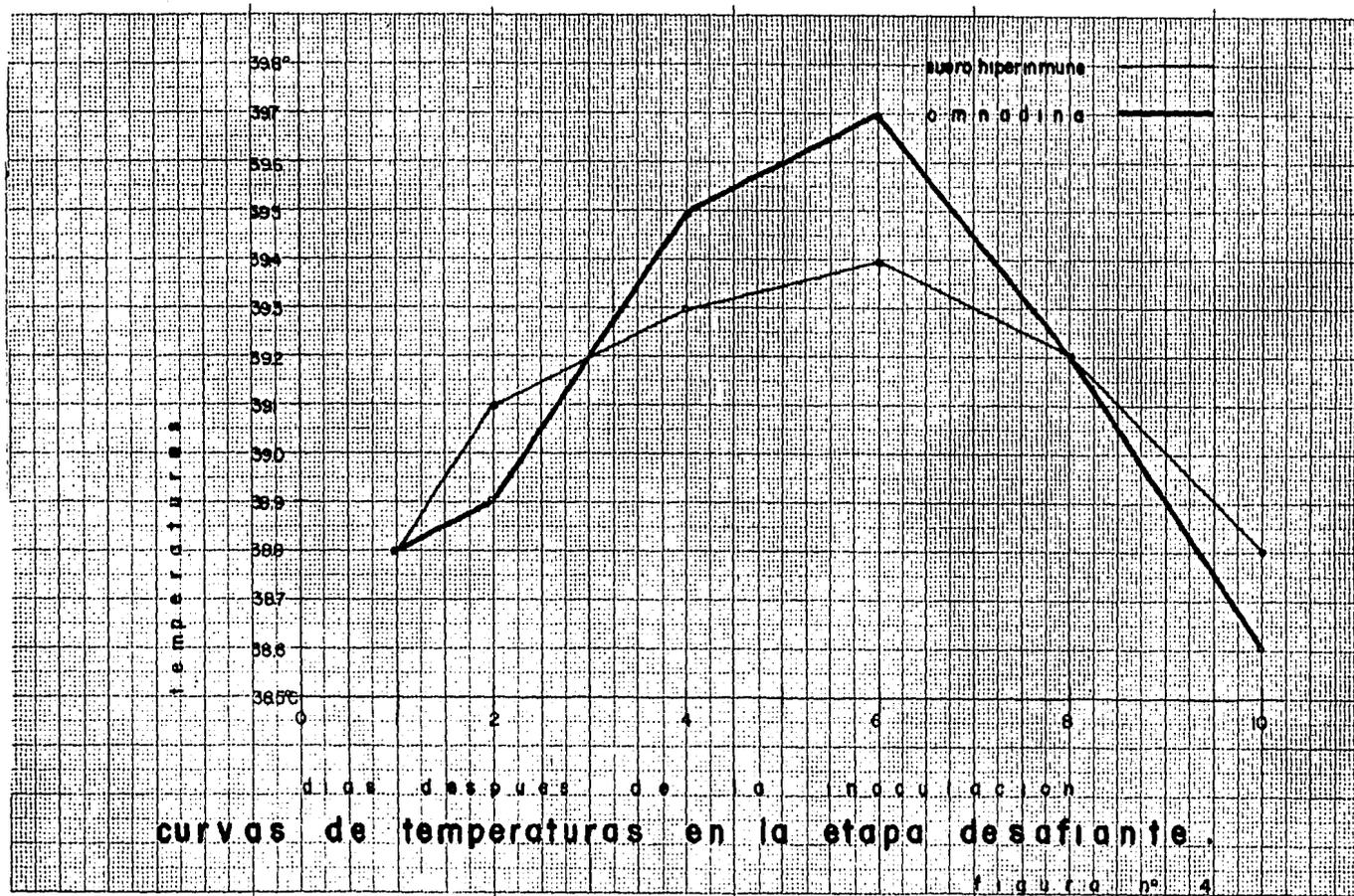
DIAS DESPUES DE LA INOCULACION

	3	6	9	12	15	
10 ⁻¹ 2 ml.	-Inapetencia -Temblor	-Inapetencia -Balanceo al caminar -Temp. elevada	-Diarrea -Respiración - -acelerada -Movimientos - -circulares -Temp. elevada	-Temp. elevada -Movimientos oscilantes -2 muertes		-1 muerte
10 ² 2 ml.	-Inapetencia -Temblor -Incoordinación -Temp. elevada	-Inapetencia -Incoordinación -Temp. elevada -1 muerte	-Diarrea -Temp. elevada -Polipnea -1 muerte		-1 muerte	
10 ⁻² .5 ml.	-Inapetencia -Parálisis -Temp. elevada	-Inapetencia -Temp. elevada -Parálisis	-Parálisis -Temp. elevada -1 cerdo en edo. de coma	-Temp. elevada -Estreñimiento -1 cerdo en edo. de coma -2 muertes		-1 muerte
10 ⁻³ 1 ml.	-Inapetencia -Temp. elevada -Temblor -Incoordinación	-Inapetencia -Temp. elevada -Parálisis	-Temp. elevada -Polipnea -1 cerdo en edo. de coma	-Temp. elevada -Estreñimiento -1 cerdo en edo. de coma	-Temp. elevada -Movimientos oscilantes -1 cerdo en edo. de coma	-Te -Es -Mo ci -1
10 ⁻³ .5 ml.	-Inapetencia -Temp. elevada -Parálisis	-Inapetencia -Temp. elevada -Parálisis	-Temp. elevada -Temblor -Paso vacilante -1 cerdo en edo. de coma	-Temp. elevada -1 muerte	-Temp. elevada -1 cerdo en edo. de coma	-Te -Mo ci -1 de -1
10 ⁻⁴ 1 ml.	-Inapetencia -Temp. elevada	-Inapetencia -Temp. elevada -Parálisis	-Temp. elevada -Parálisis -1 cerdo en edo. de coma	-Temp. elevada -2 muertes		-1 muerte

ACION DE MUERTES POR DIAS DE LA TITULACION DEL VIRUS

DIAS DESPUES DE LA INOCULACION

	9	12	15	18	21
ca da	-Diarrea -Respiración - -acelerada -Movimientos - -circulares -Temp. elevada	-Temp. elevada -Movimientos os- -cilantes -2 muertes	-1 muerte		
ón da	-Diarrea -Temp. elevada -Polipnea -1 muerte	-1 muerte			
da	-Parálisis -Temp. elevada -1 cerdo en edo. de coma	-Temp. elevada -Estreñimiento -1 cerdo en edo. de coma -2 muertes	-1 muerte		
ada	-Temp. elevada -Polipnea	-Temp. elevada -Estreñimiento -1 cerdo en edo. de coma	-Temp. elevada -Movimientos os -cilantes -1 cerdo en edo. de coma	-Temp. elevada -Estreñimiento -Movimientos os -cilantes -1 muerte	-2 muertes
a ada	-Temp. elevada -Temblor -Paso vacilante -1 cerdo en edo. de coma	-Temp. elevada -1 muerte	-Temp. elevada -1 cerdo en edo. de coma	-Temp. elevada -Movimientos os -cilantes -1 cerdo en edo. de coma -1 muerte	-1 muerte
a ada	-Temp. elevada -Parálisis -1 cerdo en edo. de coma	-Temp. elevada -2 muertes	-1 muerte		



centrado comercial de anticuerpos, dando los mismos resultados que los anteriores.

El antígeno (virus) purificado por cromatografía de columna, al ser empleado también dió los resultados anteriormente anotados.

b) Microinmunodifusión en Placa.- En microinmunodifusión en placa en ninguna de las pruebas con sus variantes se observaron líneas de precipitación.

c) Electroforesis en Acetato de Celulosa y Densitometría.- La figura No. 5 muestra la fotografía de una tira de acetato de celulosa después de haber realizado la electroforesis y tinción de un suero.

La figura No. 6 muestra la fotografía del papel milimétrico en el que se registró una de las curvas correspondientes a las diferentes fracciones séricas de una muestra después del análisis cuantitativo.

FIGURA No. 5

FRACCIONES SERICAS DESPUES DE ELECTROFORESIS.

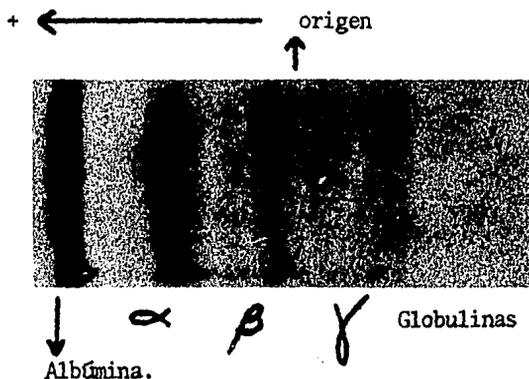
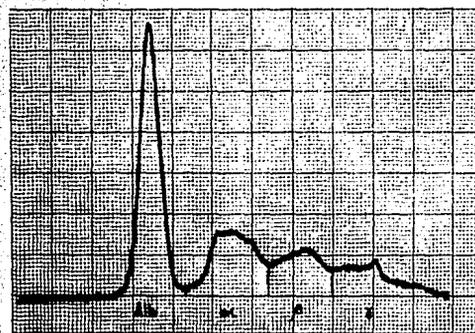


FIGURA No. 6

DETERMINACION CUANTITATIVA DE LAS FRACCIONES SERICAS
DESPUES DE LA ELECTROFORESIS.



La tabla IV indica el porcentaje de las fracciones séricas de cada uno de los sublotes y la desviación media total.

TABLA IV

PORCENTAJE DE FRACCIONES SERICAS (la desviación "standard" está indicada entre paréntesis)

VACUNA-SUERO HIPERINMUNE:

<u>cantidad de suero hiperinmune</u>	<u>albumina</u>	<u>g l o b u l i n a s</u>			<u>desviación media total</u>
		<u>alfa</u>	<u>beta</u>	<u>gamma</u>	
10 ml.	39.3 (4.5)	24.7 (5.7)	20.7 (6.7)	15.3 (3.6)	6.6
15 ml.	34.4 (3.9)	21.6 (2.7)	26.6 (5.2)	17.4 (4.4)	6.0
30 ml.	44.3 (5.9)	16.9 (3.5)	25.5 (8.7)	13.3 (5.8)	8.4

VACUNA-OMNADINA:

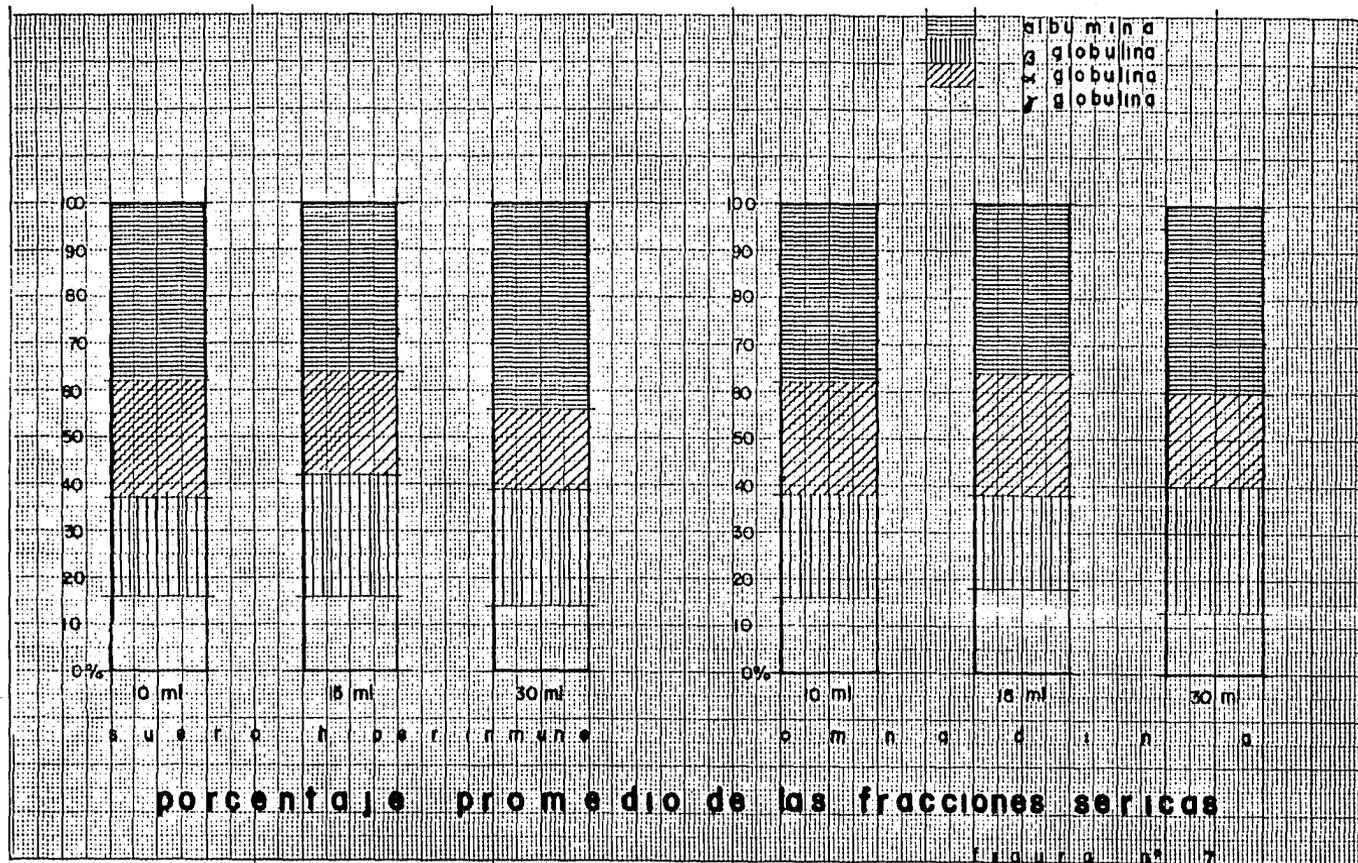
<u>cantidad de omnadina</u>	<u>albumina</u>	<u>g l o b u l i n a s</u>			<u>desviación media total</u>
		<u>alfa</u>	<u>beta</u>	<u>gamma</u>	
10 ml.	38.1 (5.2)	23.9 (5.7)	22.7 (7.1)	15.3 (7.2)	6.4
15 ml.	36.0 (16.8)	25.0 (3.4)	20.0 (3.1)	19.0 (3.2)	5.5
30 ml.	41.6 (7.6)	19.6 (6.2)	27.2 (5.5)	11.6 (3.2)	7.4

La tabla V muestra los porcentajes de la fracción gamma globulina - en orden descendente de las diferentes variantes en los dos tipos - de vacunaciones. La desviación "standard" obtenida de esta fracción está especificada para una mejor apreciación en esta misma tabla.

TABLA V

			desviación "standard"
19.0%	con	15 ml. de Ommadina	3.2
17.4%	'	15 ml. " suero hiperimmune	4.4
15.3%	'	10 ml. " ' "	3.6
15.3%	'	10 ml. " Ommadina	7.2
13.3%	'	30 ml. " suero hiperimmune	5.8
11.6%	'	30 ml. " Ommadina	3.2

La figura No. 7 muestra en una gráfica los porcentajes promedio de - las fracciones protéicas de los diferentes que recibieron vacuna-sue- ro hiperimmune y vacuna-omnadina en sus diferentes dosificaciones.

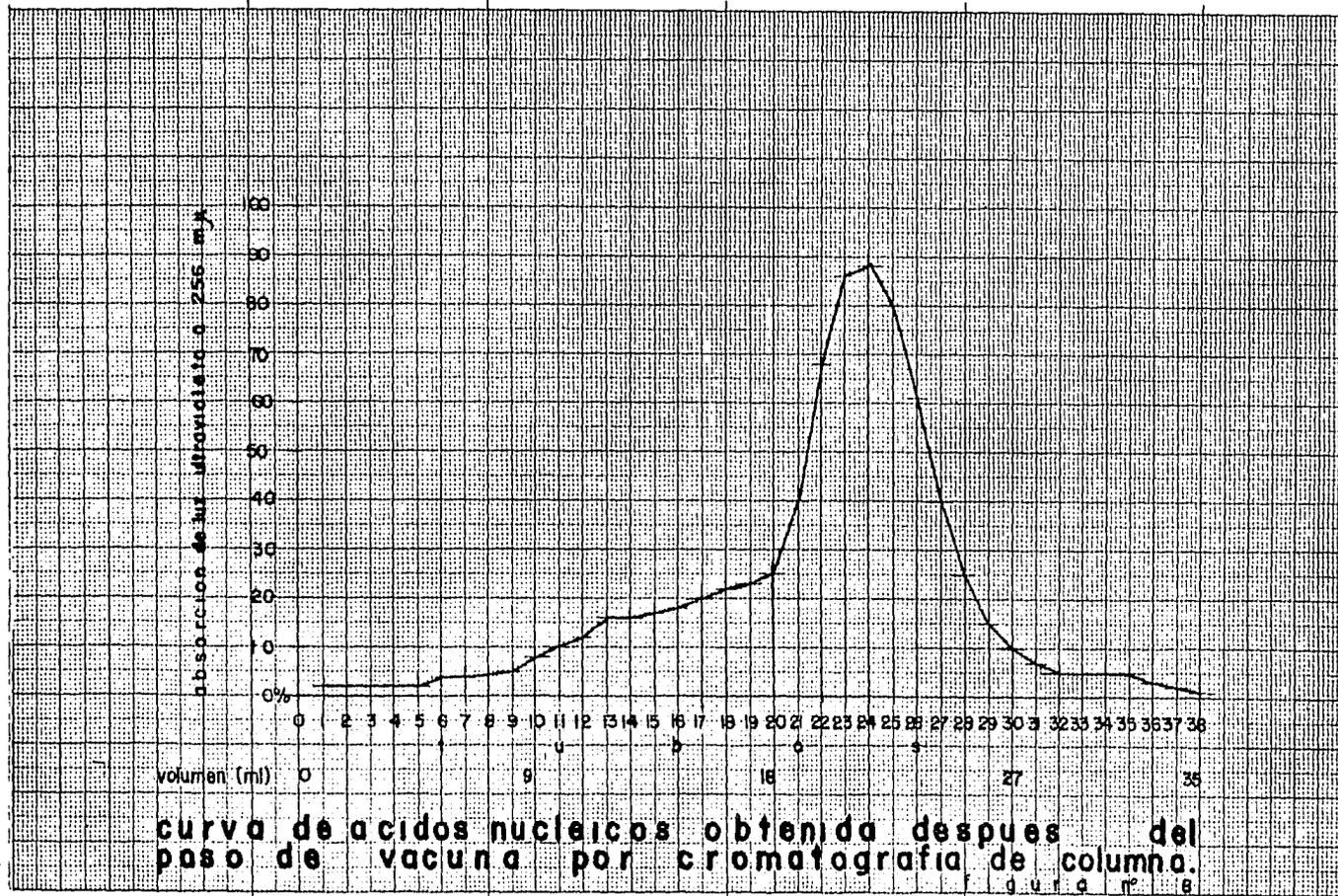


- d) Cromatografía de vacuna y sangre colérica para obtener el virus purificado.- La curva registrada del paso de ácidos nucleicos contenidos en la vacuna y separados por Cromatografía de columna está esquematizada en la figura No. 8. La figura No. 9 muestra la curva correspondiente a la muestra de sangre colérica.

La curva obtenida después del paso de la vacuna a través de la columna (fig. No. 8) mostró un pequeño pico de ácidos nucleicos hacia el tubo 14, correspondiente al paso de ácidos nucleicos de mayor tamaño molecular, con 15% de absorción de luz ultravioleta a $256 \text{ m}\mu$; un segundo pico, se observó con máxima absorción en el tubo 24, indicando el paso de aquellos ácidos nucleicos de menor tamaño molecular, con 87% de absorción de luz ultravioleta a $256 \text{ m}\mu$.

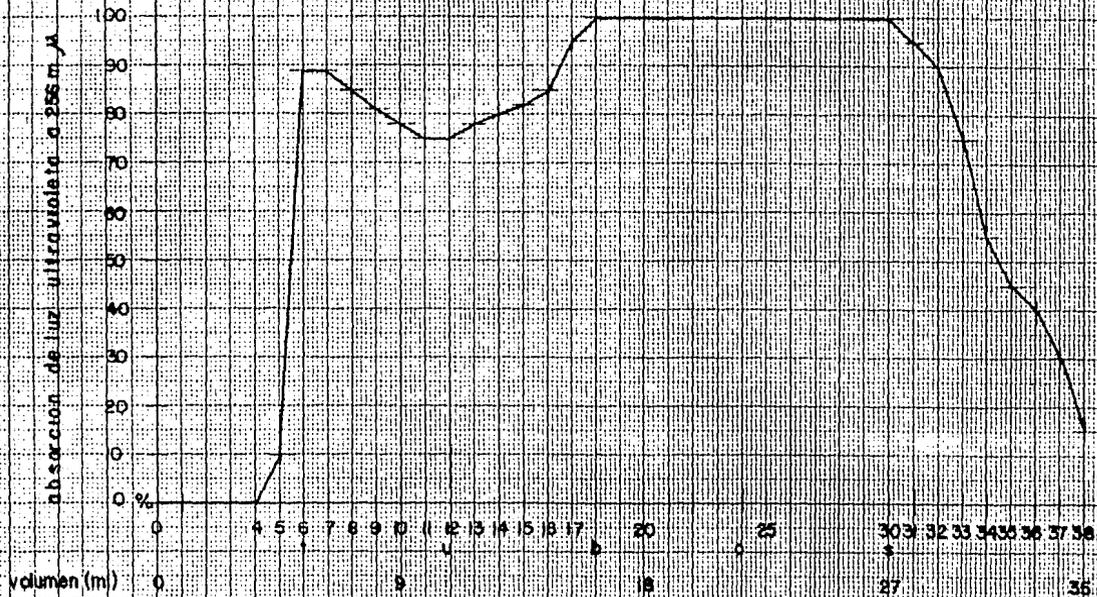
En la sangre colérica pasada a través de la columna se registraron 2 picos de ácidos nucleicos (fig. No. 9). El primero de ellos tuvo una máxima absorción de luz ultravioleta a $256 \text{ m}\mu$ en el tubo 7 de 88%. El segundo pico tuvo una absorción del 100% de los tubos 18 a 30.

- e) Microscopia Electrónica.- La muestra de virus de cólera porcino purificado por cromatografía en columna de Sepharose a partir de sangre colérica, al ser examinada en el Laboratorio de Microscopia Electrónica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M., mostró partículas virales semejantes a las observadas por Ushimi y col.(43).



curva de acidos nucleicos obtenida despues del
 paso de vacuna por cromatografia de columna.

Figura n° 8



curva de acidos nucleicos obtenida despues del paso de sangre colerica por cromatografia de columna

figura nº 8

CAPITULO IV

DISCUSION

Respecto a los resultados del grupo I, es de señalar que tanto en los 27 animales tratados con suero hiperinmune, como en los 27 tratados con ommadina, no se pudieron observar diferencias significativas en el tipo de reacciones post-vacunales en los dos grupos, a excepción de la temperatura que fué poco notable. El alza termométrica en algunos grupos de los cerdos vacunados fué más estable, especialmente en los de vacuna-suero hiperinmune con la dosificación de suero de 10 ml. y en los de vacuna-ommadina cuando ésta última se administró en 10 y 15 ml.

Una de las reacciones post-vacunales naturales, es el alza de temperatura; la elevación térmica está en relación con la multiplicación del virus dentro del individuo. Como en todos los animales vacunados se observó este fenómeno, se deduce que en todos se multiplicó el virus vacunal.

Los resultados del grupo II demostraron que la sangre colérica disponible tenía una alta virulencia. Al hacer la titulación del virus se encontró que aún los animales inoculados con la dilución 10^{-4} fallecieron al 12° y 15° día después de la inoculación. Por los síntomas observados y por la tardanza del curso provocado de la enfermedad, es de suponerse que quizá con las diluciones 10^{-7} ó 10^{-8} , se les provocaría la muerte; desgraciadamente y por carecer de los animales necesarios no pudo continuarse esta prueba para saber con exactitud en que dilución se encontraba la Dosis Letal Mínima.

La gráfica de la etapa de la exposición del trabajo (grupo IV), -- mostró un alza de temperatura similar en los dos lotes, dato que indica una respuesta semejante de los cerdos de ambos grupos ante el virus introducido y por lo tanto una inmunidad análoga.

De los resultados obtenidos in-vivo en este trabajo, se puede deducir que la aplicación de vacuna cólera porcino-omnadina como medio profiláctico resulta un método de vacunación adecuada que hasta -- cierto punto pudiera sustituir al procedimiento vigente de vacuna--suero hiperinmune.

Las pruebas in-vitro intentadas para cuantificar anticuerpos específicos contra el virus del cólera porcino, no resultaron satisfactorias. Estos resultados concuerdan con los de los otros investigadores (27,42) y en el concepto de que cada día se duda más de la importancia de los anticuerpos séricos en la medición de susceptibilidad de los cerdos al cólera porcino. En muchas enfermedades virales como son: viruela, moquillo canino, rabia, etc., se sabe que el hecho de que sus anticuerpos séricos han declinado a un nivel bajo en donde ya no pueden ser detectados, no necesariamente significa que los individuos son susceptibles de padecer la enfermedad. Por otro lado, la detección de anticuerpos circulantes tampoco es una indicación certera de que hay resistencia presente. (17). Estas observaciones apoyan la importancia de la inmunidad celular en la eliminación del antígeno y la resistencia del individuo.

Es posible que las inmunoglobulinas secretorias (IgA) (46), sean -- responsables de una buena parte de la resistencia. Estas inmunoglobulinas son sintetizadas por las células linfoides de la submucosa y atraviesan la pared celular siendo excretadas.

Se ha encontrado en sujetos voluntarios, que existe una correlación entre la resistencia a ciertas virosis y el nivel de anticuerpos -- (IgA) en las secreciones nasofaríngeas (33).

Si la concentración de anticuerpos séricos específicos contra el virus del cólera del cerdo es tan baja que impide la visibilidad de la unión antígeno-anticuerpo en las pruebas in-vitro, quizá la medición de anticuerpos (IgA) anticólera en las mucosas del cerdo, pudiera ser una prueba adecuada para valorar la resistencia a esta enfermedad.

El análisis electroforético de los sueros de los cerdos vacunados y la determinación cuantitativa de las fracciones séricas, permitió conocer variaciones en los niveles de gamma globulina de los individuos a los 68 días después de la vacunación.

Los niveles más altos de gamma globulina se obtuvieron en los animales que recibieron vacuna y 15 ml. de ommadina, pues en ellos el -- 19% de las proteínas séricas correspondía a esta fracción. El segundo nivel más alto de gamma globulina correspondió a los cerdos -- que recibieron vacuna y 15 ml. de suero hiperinmune.

En este trabajo, la cantidad óptima de suero hiperinmune y omnadina aplicada con vacuna en cerdos de 10 a 14 Kgs. de peso, fué de 15 ml. ya que en los cerdos que habían recibido 10 y 30 ml. de estos productos se observaron porcentajes menores de gamma globulina. Sin embargo, los anticuerpos medidos con este método solamente indican indirectamente el grado de resistencia de los individuos, sin importar la especificidad de dichos anticuerpos.

Sin ser un método específico, el análisis electroforético y la determinación cuantitativa de las fracciones séricas, permite evaluar hasta cierto punto la respuesta inmune-humoral consecutiva a una vacunación.

Si por los datos in-vivo, se concluyó que la inmunidad producida -- por la aplicación de vacuna-suero hiperinmune y de la vacuna-omnadina era semejante, los datos sobre los niveles de gamma globulina corroboraron lo anterior.

Cualquier vacunación provoca leucopenia, proceso que disminuye las defensas orgánicas. La aplicación simultánea de vacuna-adyuvante - puede contrarrestar la leucopenia, por producir una hiperplasia del sistema retículo-endotelial.

Los resultados obtenidos in-vivo e in-vitro en este trabajo, indican que la aplicación simultánea de vacuna-omnadina es un método -- profiláctico adecuado en el cólera porcino. Se recomienda que este método se practique en pruebas extensivas de campo con el objeto de confirmar si es apropiado en explotaciones.

La aplicación de vacuna-omnadina no provoca inmunidad inmediata, -- por lo que no sustituye en todos los casos al método tradicional de vacuna-suero hiperimmune.

CAPITULO V

SUMARIO Y CONCLUSIONES

En el presente trabajo se hace una revisión sobre algunos conceptos en relación al cólera del cerdo, con el objeto de proporcionar al lector los antecedentes más importantes que fueron tomados en cuenta para llevar a cabo este estudio.

Se describen los experimentos realizados in-vivo e in-vitro para evaluar el efecto inmunogénico de una vacuna anticólera de virus vivo atenuado de origen de cultivo aplicada simultáneamente con suero hiperimmune anticolérico, y el efecto de la misma vacuna aplicada conjuntamente con ommadina.

En las pruebas in-vivo, se estudiaron las reacciones posteriores a la vacunación, se intentó la titulación de sangre colérica y se hizo una prueba de desafío inoculando sangre colérica a los animales vacunados. Al llevarse a cabo este desafío se observó un alza de temperatura similar en los animales que habían recibido 68 días antes vacuna-suero hiperimmune y vacuna-ommadina, demostrándose una inmunidad semejante en ambos grupos.

Se hicieron dos tipos de pruebas in-vitro:

- 1.- Se trató de cuantificar anticuerpos específicos contra el virus del cólera porcino en los animales vacunados por las pruebas de Hemaglutinación pasiva y Microinmunodifusión, pero no se lograron detectar anticuerpos específicos. Este dato sos-

tiene la importancia que la inmunidad celular tiene en la resistencia contra el virus del cólera porcino.

2.- Estas pruebas in-vitro también incluyeron el análisis electroforético de los sueros de los cerdos vacunados, y la determinación cuantitativa de las fracciones séricas. Los resultados de estos estudios demostraron que los niveles más altos de gamma globulina se obtuvieron al aplicarse vacuna y 15 ml. de ommadina, ya que en este grupo la inmunoglobulinas constituan el 19% de proteínas séricas, dato que refleja el poder adyuvante del producto.

Los resultados de este trabajo indican que es posible aplicar simultáneamente vacuna-omnadina como método profiláctico en el cólera porcino. Se recomienda que se confirmen estos resultados practicando este tipo de vacunación en pruebas de campo. Si resulta satisfactorio, la principal ventaja sería el poder reducir los costos de la vacunación.

La profilaxis con vacuna-omnadina no sustituye al método de vacuna-suero hiperinmune en granjas infectadas o para controlar brotes, ya que éste último si confiere inmunidad inmediata.

CAPITULO VI

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Alvarez López M. (1962)
Aplicación del método de Inmunodifusión en el estudio de las -
posibles diferencias antigénicas entre 3 cepas del virus tortor
suis empleadas para la producción de vacunas comerciales.
Tesis E.N.M.V.Z. U.N.A.M.
- 2.- Bieling R. y Brauer L. (1937)
Die Unspezifische Immuntherapie.
Behringwerke-Mitteilungen Nr. 8
- 3.- Boyden S.V. (1951)
Fixation of bacterial products by erythrocytes treated with -
Tannic Acid and subsequent hemagglutination by anti-protein.
J. Exp. Med. 93:107
- 4.- Coggin y Col. (1964)
Standardization of Hog Cholera Neutralization test.
Amer. J. Vet. Res. 25:408-412
- 5.- Cole y Henley (1949)
Citado por Hagan W.A. y Bruner D.W. (1961)
Enfermedades Infecciosas de los Animales Domésticos ,2a. Edi -
ción. La Prensa Médica Mexicana, México.
- 6.- Creyssel R. (1967)
Structure et Metabolisme des Gammaglobulines.
La Medicine Infantile 74:527-549
- 7.- Doll J.R. y Brown R.G.(1954)
Isohemolytic disease of newborn pigs.
Cornell Veterinarian 86:44
- 8.- Dunne H.W. y Kradel D.C. (1961)
Investigation into "Serum Block"
Proc. 65 Ann. Meet.
U.S. Livestock Sant. Ass. Págs. 323-332

- 9.- Dunne H.W. (1966)
The control of pigs by immunization.
Cornell Veterinarian 56:(2) 293-299
- 10.- Erradicación del cólera en los cerdos. (1966)
El Veterinario y la Industria. 3(2):27
- 11.- E.U.M.--S.I.C. (1965)
IV Censo agrícola, ganadero y ejidal.
México D.F.
- 12.- Flores Menendez J.A. (1965)
Ganado Porcino. Pág. 162
Ed. Agrícolas Trucco, México.
- 13.- Gelman Instrument Company. (1967)
Gelman Equipment for Immuno-electrophoresis and Immunodiffusion.
Boletín 279, Ann Arbor, Michigan.
- 14.- Gelman Instrument Company. (1967)
Gelman Procedures, Techniques and Apparatus for Electrophoresis.
Ann Arbor, Michigan.
- 15.- Gericke D. (1957)
Effect of bacterial endotoxins on the Reticulo-Endothelial System.
Federation Proceedings. pág. 862
- 16.- German D. (1967)
Les processus cellulaires de la lutte anti-infectieuse.
La Medicine Infantile 74:521-526

- 17.- Gorham J.R. (1965)
 The age incidence of Distemper.
 Southwestern Veterinarian 18(4):271-275
- 18.- Kabat E.A. y Mayer M.M. (1964)
 Experimental immunochemistry.
 2a. Ed. Charles C. Thomas.
 Springfield, Illinois.
- 19.- Koehler A., Brueckner A.H., Dazey W.H., Mayer K. y Johnston R.
 Relative amounts of immunoglobulins and inert proteins.
 Allied Veterinarian, Enero-Febrero.
- 20.- Kumagai T., Shimizu T., Ikeda S. y Matsumoto M. (1961)
 A new in-vitro method (E.N.D.) for detection and measurement
 of Hog Cholera virus and its antibody by means of effect of
 HC virus on Newcastle disease virus in Swine tissue.
 J. Immunology 87:245-256
- 21.- Kwapinski J.B. (1965)
 Methods of Serological Research.
 John Willey and Sons Inc., Nueva York.
- 22.- Langer P.H. (1963)
 Development of Heterotypic Bovine virus Diarrhea (B.V.D.) va
 ccine against Hog Cholera.
 Proc. 67 th. Ann. Meet.
 U.S. livestock Sant. Ass. Págs. 358-365
- 23.- Lin T.C., Kang B.J., Shimizu Y., Kumagai T. y Sasahara J. (1968)
 Evaluation of the Fluorescent antibody-cell culture test for
 detection and titration of Hog Cholera virus.
 Nat. Inst. of anim. Health Quaterly 9:10-19

- 24.- McBryde y Cole. (1936)
Citado por Hagan W.A. y Bruner D.W. (1961)
Enfermedades Infecciosas de los Animales Doméstico, 2a. edición
La Prensa Médica Mexicana, México.
- 25.- Mejía Laguna y Biro C. (1969)
Transformación Blastoide de Linfocitos de Conejo sensibiliza -
zos con gamma globulina humana agregada.
Archivos del Inst. de Cardiología de Méx. 39:388-397
- 26.- Mengeling W.L. y Torrey J.P. (1967)
Evaluation of the fluorescent antibody-cell culture test for -
Hog Cholera diagnosis.
Amer. J. Vet. Res. 28:1653-1659
- 27.- Milliam S.J. y Englehard (1961)
Aplication of the Conglutination Complement Absortion test to_
detect Hog Cholera antibodies.
Amer. J. Vet. Res. 26:396-400
- 28.- Morales I. (1970)
Comunicación personal.
- 29.- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y
la Alimentación. (F.A.O.) (1962)
Informe de la junta en Santiago de Chile, Chile.
Mayo 7-18.
- 30.- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y
la Alimentación./ Oficina Internacional de Epizootiología.
(1956). Rapport Mondial sur les Maladies du Betail.
F.A.O./O.I.E.
- 31.- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y
la Alimentación. (F.A.O.) (1967)
Sixth F.A.O. inter-american conference on animal production --

and health.

Sept. 10-20, Gainesville, Florida.

- 32.- Organización Mundial de la Salud. (1967)
Alcance y efectos de la Inmunología.
Chronique O.M.S. 21:324-329
- 33.- Organización mundial de la Salud. (1969)
Inmunología del Cólera.
Informe de un grupo científico.
Org. Mund. Salud, Inf. Téc. # 44 Ginebra.
- 34.- Ouchterlony O. (1958)
Diffusion in gel methods for Immunological analysis.
Progr. Allergy 5:1
- 35.- Perez Tamayo R., Larralde C. y Krestchimer R.R. (1968)
Inmunopatología/
La Prensa Médica Mexicana, México.
- 36.- Pillener L. (1957)
The nature of the Properdin System and its interactions with
polysaccharide complexes.
pág. 233 ,Nueva York Acad.
- 37.- Poul J. (1962)
Les protéines sériques du porc au cours de l'hyperimmunisa-
tion contre la peste porcine.
Archives de l'institute Pasteur de'algerie. 40:44-52
- 38.- Salmon y Smith (1885)
Citado por Hagan W.A. y Bruner D.W. (1961)
Enfermedades Infecciosas de los animales domésticos. 2a. Ed.
La Prensa Médica Mexicana ,México.

- 39.- Segre D. (1962)
Detection of Hog Cholera virus by Hemagglutination test.
Amer. J. Vet. Res. 23:748-750
- 40.- Steele J.H. (1964)
Seminario sobre la enseñanza de Medicina Preventiva y Salud -
Pública.
Organización Mundial de la Salud. (O.M.S.)
- 41.- Takahashi Y., Fujita S., Sasaki A. (1961)
The specificity of the Passive Hemagglutination methods used
in serology of Tuberculosis.
J. Exp. Med. 111:1141
- 42.- Tellez Girón R. (1964)
Estudio de la prueba de Absorción de Complemento Conglutinan-
te para detectar anticuerpos contra el virus del Cólera Porci-
no. Tesis E.N.M.V.Z. U.N.A.M.
- 43.- Ushimi C., Tajima M., Tanaka S., Nakajima H., Shimizu Y. y Fu-
ruchu S. (1968)
Nat. Inst. of anim. Health Quaterly 9:28-34
- 44.- Villegas Salas E. (1970)
Situación de la Ganadería Porcina en México.
Tesis F.M.V.Z. U.N.A.M.
- 45.- Weide K.D. y King N.B. (1962)
Electrophoretic studies of passive immunity against Hog Chole-
ra in young pigs.
Amer. J. Vet. Res. 23:744-747
- 46.- Weiser R.S., Myrvik Q.N. y Pearsall N.N. (1969)
Fundamentals of Immunology.
Lea and Febiger. Filadelfia.