

79
Res



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA**

DEPARTAMENTO DE PRODUCCION ANIMAL: CERDOS

**EMPLEO DEL MERCAPTOETANOL EN LA PRUEBA DE
INHIBICION DE LA HEMOAGLUTINACION PARA EL
DIAGNOSTICO DEL PARAMIXOVIRUS DE OJO AZUL
EN CERDOS.**

FALLA DE ORIGEN

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

GUADALUPE ESPINOZA RANGEL



ASESORES:

**M.V.Z. M.P.A. HUMBERTO RAMIREZ MENDOZA
M.V.Z. MARIA DEL CARMEN MERCADO GARCIA**

MEXICO, D. F.

1995



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**EMPLEO DEL MERCAPTOETANOL EN LA PRUEBA DE INHIBICION DE LA
HEMOAGLUTINACION PARA EL DIAGNOSTICO DEL PARAMIXOVIRUS DE**

OJO AZUL EN CERDOS

**Tesis presentada ante la
División de estudios Profesionales de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
de la
Universidad Nacional Autónoma de México
para la obtención del título de
Médico Veterinario Zootecnista
por:**

Guadalupe Espinoza Rangel

**Asesores: M.V.Z. Humberto Ramírez Medoza
M.V.Z. María del Carmen Mercado García**

México, D. F. 1995.

DEDICATORIAS

Amigo Jesús

Sobre la arena de la playa

caminaba con El Señor

En el firmamento se dibujaban escenas
de mi vida y a su vez noté dos juegos
de pisadas en la arena,
uno era mío, y el otro de Jesús.

Cuando mire hacia atrás para ver las
huellas, noté que varias veces a lo largo
del camino de mi vida, había solamente
un juego de pisadas, esto había sucedido
en los tiempos más dolorosos y tristes de mi vida

¿Pregunté al Señor?

Señor por que no caminaste a mi lado
en los momentos de mi vida mas difíciles
ya que solo habia un par de huellas,

Jesús contesto

Hija amada yo te quiero mucho y nunca
te abandonaria, ese par de hullas eran
mías por que yo te llevaba en mis brazos.

A LA MEMORIA DE MIS QUERIDOS

PADRES

**Después de tantos tropiezos en mi camino
estoy intentando lograr cumplir con su mayor
deseo, y del cual si estuvieran conmigo aquí
estarían enormemente felices**

A ellos que tanto amé.

Hermana Carmen

**Quien siempre nos cuidó, apoyo y
nos dió el cariño y amor del que
carecíamos.**

Gracias.

A Emanuel

Ojos que me miraron aquel día,
con embeleso y carifoso encanto,
ojos, claros, tiernos y serenos,
a quien canto la dulce y amorosa
sinfonía del adiós.

Ojos que ya no me amarán,
os digo yo lo que siento
¿por que me daís cruel tormento,
cuando de mi os alejáis?

Ojos tiernos que me miraron,
en donde sus pupilas se asomaron
para bañarse en agua de amor y cariño;
Ojos cual linfas de tranquilo lago,
de belleza infinita, de terneza de niño,
Ojos que ya no me miráis a vos mando mi
trizte lamento y mi dolor infinito que
se esparce en mi alma a raudales.

Para mi hermano Adolfo:

**Con todo mi amor
para el ser más maravilloso de la tierra.
Tiene sus ojos tristes
la mirada cansada
Su cabeza blanca
Pero el alma de un roble
y la fuerza del mar
Cultivo 9 vidas
por las que ignoramos todas
las penas y amarguras que pasó
pero no envano luchó ya que
profesionistas forjo a cambio
le entregamos un título que se
ganó en nuestro corazón
Gracias Padre.**

Para mi hermano Adolfo:

**Con todo mi amor
para el ser más maravilloso de la tierra.**

Tiene sus ojos tristes

la mirada cansada

Su cabeza blanca

Pero el alma de un roble

y la fuerza del mar

Cultivo 9 vidas

por las que ignoramos todas

las penas y amarguras que pasó

pero no envano luchó ya que

profesionistas forjo a cambio

le entregamos un título que se

ganó en nuestro corazón

Gracias Padre.

Amado Frank

Por que al mirarme en tus ojos
sueños tan bellos me forjarías,
mira , mirame a mi nada más,
Por que un beso como el que me diste
nunca me habian dado y sentirme
estrechada en tus brazos nunca los soñe
Este amor como el tuyo y el mio no
existe en la vida, en este mundo ya
no quedan seres que quieran asi
Siempre te amare

KATHYA

Eres lo más bello que Dios me regaló
te quiero por travieza, por inquieta
por latosa, por todo lo que haces y
escondes en esa carita de pinga.

Además,

te voy a decir un secreto
yo no podria vivir sin tí

Te Amo

Tengo un tesoro muy grande

y siempre lo cuento

y mis piedras preciosas son:

Antonio

Tony

Virginia

Adolfito

Ma. Elena

Laura

Gustavo

Arlyne

Ether

Paulina

Oscar

Mario

A mis Suegros

**Francisco y Leonor que me apoyaron siempre,
soportando mis triunfos y derrotas
dandome consejos positivos como ellos y
albergando en su corazón este momento.**

Los quiere Lupita

A mis compañeros

Llerena, Lidia, Isabel

Raúl y Jesús.

AGRADECIMIENTOS

A mi Jurado

La amistad es el más noble y humilde de los sentimientos

Crece al amparo del desinterés, se nutre dándose,

no admite cálculos, ni sombras, ni medallas

Exige en cambio:

Sacrificio, valor, comprensión y verdad

sobre todas las cosas.

Gracias

A mis Asesores

**Con admiración y respeto por todo su valioso tiempo
depositado en mí por levantarme en mis momentos difíciles**

y, sobre todo, por que siempre confiaron en mí

Mil gracias

Al Departamento de Producción Animal: Cerdos

Por todo su apoyo incondicional

Por todo lo que aprendí

Y lo que soy.

CONTENIDO

	PAGINAS
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
CARACTERISTICAS DEL VIRUS	3
PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DEL VIRUS	3
EPIZOOTIOLOGIA	4
SIGNOLOGIA	5
LESIONES MACROSCOPICAS	6
LESIONES MICROSCOPICAS	7
DIAGNOSTICO	8
TRATAMIENTO	9
PREVENCION Y CONTROL	9
RESPUESTA INMUNE	10
PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DEL MERCAPTANOL	11
HIPOTESIS	12
OBJETIVO	13
MATERIAL Y METODOS	14
METODO ESTADISTICO	19
RESULTADOS	20
DISCUSION	22
CONCLUSION	24
LITERATURA CITADA	25
CUADROS	30

RESUMEN

Uso del mercaptoetanol en la prueba de inhibición de la hemoaglutinación para el diagnóstico del Paramixovirus de Ojo Azul en cerdos. Presenta: Guadalupe Espinoza Rangel. Asesores: M.V.Z. Humberto Ramírez Mendoza y M.V.Z. María del Carmen Mercado García.

El presente trabajo consistió en un estudio experimental que se realizó en el Departamento de Producción Animal: Cerdos, en el laboratorio de Virología y consistió en la inoculación del virus de Ojo Azul (POA) en 3 cerdos jóvenes y en 4 cuyes jóvenes libres de esta enfermedad. Se realizaron muestreos semanales, iniciándose el primero una semana antes de la inoculación y posterior a esta, siendo en total de 6 en cerdos y 4 en cuyes. Se trabajaron todas las muestras juntas por especie, empezando con la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación (IHA) y posteriormente se trabajó esta misma prueba más el Mercaptoetanol, sustancia que ayudó a determinar la presencia de una infección temprana. Cuando se compararon ambas pruebas se observó que en la prueba de IHA durante la primera semana los resultados fueron bajos para ambas especies, notándose los ascensos de anticuerpos a partir de la segunda semana postinoculación, presentándose en los cerdos una gran variación en los sueros trabajados con el Mercaptoetanol. Una vez obtenidos los resultados se realizó un diseño por bloques completos al azar con el fin de observar las diferencias entre molaridades de los animales inoculados con los testigos. Se concluye que el virus es específico del cerdo ya que se obtuvo una notable seroconversión, además de que en esta especie se pudo observar una variación significativa entre los sueros trabajados con la prueba de IHA y la prueba de IHA más el mercaptoetanol. De esta forma logramos comprobar que si es posible detectar una infección temprana de una que no lo es, siendo la concentración 2 molar la más adecuada para este trabajo.

INTRODUCCION.

En La Piedad, Michoacán, México apareció una nueva enfermedad en el cerdo detectada en el año de 1980 (3,6) que se caracterizó por alteraciones en el sistema nervioso central y afección en ojos (uni o bilateral) causando una opacidad azul turquesa de la córnea, siendo por este signo que se le denominó Síndrome del Ojo Azul (SOA) (13).

Esta enfermedad se diseminó rápidamente en algunos estados colindantes y en otros del territorio nacional. En 1980 Jalisco y Guanajuato; 1982 Estado de México; 1983 Distrito Federal, Nuevo León, Hidalgo, Tlaxcala, Querétaro, Tabasco, Yucatán, Puebla, Campeche y Quintana Roo y en 1984 en Tamaulipas (6,15,20).

Es causada por un virus que pertenece a la familia Paramixoviridae, que posee propiedades hemoaglutinantes diferentes a las que se habían informado previamente para otros virus capaces de afectar al sistema nervioso central del cerdo, y de otros animales domésticos) (21).

La primera inoculación experimental se realizó en dos cerdos comerciales de 10 días de edad, en los que no se observaron signos clínicos de la enfermedad; desafortunadamente no se intentó el aislamiento del virus ni se realizaron estudios serológicos para analizar la seroconversión (21).

Posteriormente se inocularon ratones por tres diferentes vías, desarrollándose signos nerviosos, conjuntivitis y neumonía intersticial, recuperando el virus de diferentes tejidos (encéfalo, pulmón, hígado y riñón (21).

CARACTERISTICAS DEL VIRUS

Se replica con facilidad en cultivos primarios de células de riñón de cerdo, tiroides de bovino y en líneas celulares como: riñón de cerdo (PK15) y testículo de cerdo (ST), riñón de mono (Vero maru), riñón de gato (CK), embrión de bovino (BEK), riñón de hamster (BHK) (21).

En las células PK15 produce efecto citopático, con formación de sincitios (caracterizado por fusión de 3 a 20 núcleos o más), dentro de las 24 a 48 horas después de la inoculación (7,8,12,21), también se observan células individuales redondas voluminosas que se desprenden y quedan suspendidas en el medio de cultivo.

Se forman vacuolas en el citoplasma, y a los 7 días se ve el efecto citopático completo (12,21).

PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DEL VIRUS

Tiene la capacidad de hemoaglutinar eritrocitos de una gran variedad de mamíferos (vaca, caballo, cabra, cerdo, conejo, cuye, gato, hamster, rata, ratón y humano) y aves (gallina doméstica) (21,22). Causa elusión a 37°C entre los

30 y 60 minutos y existe hemoadsorción de los eritrocitos señalados en células PK15 a las 72 horas postinfección.

El virus se inactiva a 56°C después de 4 horas, mientras que la hemoaglutinación viral se pierde entre las 48 y 60 horas a 56°C. Es sensible a solventes de lípidos (éter y cloroformo) causando su inactivación. Es resistente a la actinomicina-d indicando la presencia de RNA en su genoma (20,21,22).

Serológicamente se observa que el virus aislado no está relacionado con el Paramixovirus 1 (PMV), Sendai-Newcastle 2,3,4,6,7, Parainfluenza 1,2,3,4a,4b,5 y no se ha relacionado con antisueros de Paramixovirus conocidos, ni con el Coronavirus de la Encefalitis por Virus Hemoaglutinante (EVH) (16,21,22).

EPIZOOTIOLOGIA

El cerdo es la única especie en donde se ha comprobado la enfermedad, pero experimentalmente afecta al ratón y al embrión de pollo, además se intentó en conejo adulto pero este no seroconvirtió (21).

La principal vía de entrada de la enfermedad a una granja es la introducción de cerdos infectados asintomáticos con o sin opacidad de la córnea a hatos libres (21). La transmisión por contacto directo se facilita debido a que los cerdos de más de 30 días son resistentes generalmente a la presentación de signos nerviosos, y sólo un reducido

número de cerdos (1-10%) desarrolla opacidad de la córnea, siendo así portadores asintomáticos del virus (21).

La aparición de la enfermedad en las diferentes etapas de la vida del cerdo ha permitido la permanencia del virus dentro de una granja (21,22).

En granjas engordadoras, la morbilidad (medida a partir de la presentación de opacidad de la córnea) va del 1 al 20%, con una mortalidad aproximada del 1% que puede incrementarse cuando se asocia con alguna enfermedad bacteriana (23).

SIGNOLOGIA

Los signos clínicos son variables dependiendo de la edad del animal afectado, siendo los lechones entre 2 y 15 días de edad los más susceptibles, presentando signos clínicos súbitamente, inicialmente fiebre, eritema cutáneo, pelo erizado, lomo arqueado, constipación, posteriormente los signos nerviosos: incoordinación, debilidad, rigidez (principalmente de miembros posteriores) temblores musculares, postura anormal (de perro sentado) marcha rígida, hiperexcitabilidad, posteriormente se postran de un lado y finalmente se ven letárgicos, con movimientos involuntarios, mirada perdida, pupila dilatada, nistagmus, opacidad de la córnea uni o bilateral, ceguera, ocurriendo su muerte entre 30 y 48 horas después de su postración (20, 22).

En cerdos de más de 30 días, los signos nerviosos son raros y la mortalidad es baja. Cuando llegan a presentar signos nerviosos se observa: anorexia, depresión, incoordinación, marcha en círculo, movimientos pendulares de la cabeza, conjuntivitis y opacidad de la córnea. (21)

En los animales reproductores, al igual que las cerdas en maternidad, ocasionalmente desarrollan opacidad de la córnea a excepción de cerdas primerizas que no han tenido contacto con el virus. Sin embargo también se producen fallas en el ciclo reproductivo, como aumento en el número de lechones nacidos muertos (2-24%) aumento en las repeticiones del celo (15-20%) aumento en el número de abortos, disminución en el porcentaje de fertilidad (6-8 semanas) y presencia de fetos momificados (1-5%) (22, 23).

En granjas de ciclo completo, el brote agudo con mortalidad en lechones, puede durar de 2 a 9 semanas (dependiendo básicamente del número de cerdas que paren durante el brote y del número de lechones nacidos). (19)

Presentándose casos de opacidad de la córnea continuamente entre uno y dos meses más y desapareciendo ésta progresivamente (18,20).

LESIONES MACROSCOPICAS

En la mayoría de los estudios postmortem de lechones se puede observar: opacidad y edema de la córnea uni o bilateral del 1 al 10% de los lechones, el grosor del edema llega a medir hasta 3 mm, presentan neumonía que afecta a

los bordes ventrales de los lóbulos craneales pulmonares, así como congestión meníngea, atrofia serosa de la grasa coronaria, moderada distensión gástrica con leche, acumulación de líquido peritoneal con finas bandas de fibrina en cavidad peritoneal y distensión de vejiga por orina (18,20).

LESIONES MICROSCOPICAS

En lechones los principales cambios se observan en sistema nervioso central, existiendo variantes en la severidad y extensión de la enfermedad. Primordialmente se observa encefalomiелitis que afecta la sustancia gris del tálamo, cerebro medio y corteza cerebral. Hay marcada gliosis focal y difusa, inflamación linfocitaria perivascular (linfocitos, células plasmáticas y células reticulares), neuronofagia, necrosis neuronal y glial, meningitis y coroiditis y no se observan cuerpos de inclusión (20,22).

A nivel pulmonar se observan neumonía intersticial, caracterizada por engrosamiento alveolar por células mononucleares (20,22).

En ojo se presenta edema variable, infiltración de células mononucleares y neutrófilos en el endotelio corneal, unión esclerocorneal, en el ángulo iridocorneal, en iris y nervio óptico (20,22).

DIAGNOSTICO

Los signos clínicos clásicos de la enfermedad dan bases para el establecimiento de un diagnóstico clínico previo, sin embargo para atribuirlos al virus de la enfermedad de ojo azul es indispensable realizar estudios para demostrar la presencia del virus o anticuerpos contra éste en el animal.(7)

Las pruebas diagnósticas que se pueden utilizar son:

- A) Aislamiento del virus principalmente de encéfalo, tonsila y pulmón.
- B) Inmunofluorescencia.
- C) Sueroneutralización.
- D) Inhibición de la hemoaglutinación.

Diagnóstico diferencial:

- a) Gastroenteritis Transmisible de los cerdos (GET).
- b) Enfermedad de Aujeszky (EA).
- c) Deficiencia de Vitamina A.
- d) SMEDI.
- e) Parvovirus (PV).
- f) Influenza Porcina (IP).
- g) Enfermedad del Edema.(EE)

TRATAMIENTO

No hay tratamiento específico que pueda utilizarse contra el virus, sin embargo, la medicación contra infecciones bacterianas concurrentes ayuda a reducir la mortalidad y un posible retraso en el crecimiento.

PREVENCIÓN Y CONTROL

Así como en otras enfermedades, lo más importante estriba en evitar la entrada de la enfermedad siguiendo medidas preventivas que hagan mínimo el riesgo de adquirir la enfermedad.

No existe vacuna comercial contra la enfermedad del ojo azul.

RESPUESTA INMUNE

Una vez que la infección se ha establecido y los signos son evidentes poco se puede hacer para alterar el curso de la enfermedad siendo clínicamente autolimitante.

Las principales inmunoglobulinas que se producen en una infección temprana son IgG e IgM.

La clase IgG es la que incluye el mayor número de inmunoglobulinas (1700 a 2000 mg/100ml en el cerdo) ya que constituye el 80% del total en el plasma sanguíneo, también se encuentra en los líquidos corporales (saliva, lágrimas,

líquido cefalo raquídeo) y es la más pequeña de todas ². Una IgG específica se forma solamente en pequeñas cantidades después de la primera exposición del antígeno al sistema inmune, pero se producen y liberan cantidades elevadas después de las exposiciones segunda y posteriores. Esta inmunoglobulina suele ser divalente ya que en cada molécula posee dos lugares de fijación para antígenos. Su estructura química esta compuesta por dos cadenas "H" idénticas, unidas por un par de enlaces disulfuro y dos cadenas "L" idénticas unidas cada una a una cadena pesada por un enlace cruzado de disulfuro. Tiene una vida media aproximada de un mes (2).

La IgM es la de mayor peso molecular. Son predominantemente intravasculares, y constituye aproximadamente el 10% (100 a 500 mg/100 ml en el cerdo) del total de inmunoglobulinas en el plasma. La proporción de IgM es máxima después de la primera exposición a un antígeno, pero también se producen pequeñas cantidades con exposiciones subsiguientes o con estimulación continua, por ejemplo la flora bacteriana del intestino. Los anticuerpos para bacterias gram negativas son predominantes del tipo IgM. Su estructura química esta compuesta por 10 cadenas pesadas "H" y 10 cadenas ligeras "L", por molécula sólo hay 5 lugares de fijación antigénica. Aproximadamente tiene una vida media de 10 días (2).

PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DEL MERCAPTOETANOL

El mercaptoetanol es un compuesto orgánico, su estructura molecular ($\text{CH}_2\text{OHCH}_2\text{SH}$) es el resultado de la combinación de un alcohol (etanol $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) y compuestos azufrados (mercaptano R-SH) que tiene la capacidad de combinarse con compuestos que contengan enlaces disulfuro formando dímeros de mercaptano (2,8,15).

Sus propiedades físicas incluyen ser incoloro, insoluble en agua y de olor penetrante y desagradable, su punto de ebullición es de unos 30 grados menor que la del etanol, la energía de disociación de sus enlaces es de 80 Kcal/mol en comparación con las 110 Kcal/mol de los alcoholes (15).

Con el empleo de agentes químicos como el mercaptoetanol se pueden facilitar los diagnósticos de algunas infecciones tempranas, como por ejemplo en el caso de Brucella y Parvovirus en cerdos (1,8,12,15) ya que éste fragmenta la molécula de IgM que es producida durante la primera exposición con el antígeno, dejando moléculas libres de IgG no funcionales y que no pueden ser detectadas por las pruebas convencionales de diagnóstico (Pruebas de Aglutinación para Brucella y la prueba de IHA para PPV) ya que estas solo detectan moléculas de IgG elaboradas en forma natural y reciente (1,9,11 y 15).

HIPOTESIS

El uso del mercaptoetanol en la prueba de Inhibición de la hemoaglutinación (IHA) permite diferenciar una infección reciente de una que no lo es, en la enfermedad causada por el Paramyxovirus del Ojo Azul.

OBJETIVOS

- 1.- Disponer de una técnica o procedimiento en el diagnóstico de infecciones recientes contra el POA en cerdos.
- 2.- Determinar la molaridad apropiada del mercaptoetanol en la prueba de IHA para el procesamiento de sueros de cerdo con anticuerpos contra POA.

MATERIAL Y METODOS

El presente estudio se realizó utilizando animales libres del POA (cuyes y cerdos adultos) los cuales fueron inoculados por vía intramuscular e intranasal con virus virulento de ojo azul, de los cuales se tomaron varias muestras de sueros que fueron trabajadas por la técnica de Inhibición de la Hemoaglutinación e IHA e IHA más mercaptoetanol en tres diferentes molaridades para observar si existía variación o no en los títulos de anticuerpos.

VIRUS

El antígeno que se empleó fue la cepa PAC II fase 3 el cual se replicó en células PK15 alcanzando un título de 128 Unidades Hemoaglutinantes (UHA) congelándose y descongelándose para la liberación del virus de la célula. El cual fue utilizado con ese título para la inoculación de los animales.

Posteriormente se tituló con la prueba de hemoaglutinación hemoaglutinación (HA) y se ajustó hemoaglutinantes (UHA) cuando se realizó la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IHA).

ANIMALES

Se utilizaron 4 cuyes libres de POA, hembras, cepa Hartley (pelo corto, blanco, ojos rojos), que pesaron 500g, de 3 meses de edad, que fueron inoculados con el POA, por

vía intramuscular (1 ml) e intranasal (0.5 ml); y 3 cerdos jóvenes libres de POA, machos, razas Landrace, Hampshire y criollos, todos de 1 año y dos meses de edad, a los cuales se les aplicó 3 ml intramuscular y 3 ml intranasal del mismo virus, siendo para ambas especies dosis única.

Los animales se sangraron cada 7 días después de la inoculación hasta completar 4 muestras en los cuyes y 6 en los cerdos.

VIA Y VOLUMEN DEL SANGRADO

Los cuyes se sangraron por punción intracardiaca realizando asepsia del área precordial con una torunda impregnada de alcohol, la sangre se recolectó en tubos Vacutainer [®] obteniendo 1 ml por toma.

De los cerdos la muestra se tomó de la vena yugular obteniendo 3 ml por toma. Después de la punción se les aplicó un desinfectante y compresión digital con una torunda seca hasta detener el sangrado.

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

El tubo colector con la muestra sanguínea se inclinó a 45° hasta que se coaguló y se procedió a la remoción del coágulo en forma estéril al separarse del suero; los tubos se colocaron en una centrifuga a 2,000 rpm durante 10 minutos, tomándose posteriormente los sobrenadantes (sueros) que fueron inactivados en baño maría a 56°C durante 30

vía intramuscular (1 ml) e intranasal (0.5 ml); y 3 cerdos jóvenes libres de POA, machos, razas Landrace, Hampshire y criollos, todos de 1 año y dos meses de edad, a los cuales se les aplicó 3 ml intramuscular y 3 ml intranasal del mismo virus, siendo para ambas especies dosis única.

Los animales se sangraron cada 7 días después de la inoculación hasta completar 4 muestras en los cuyes y 6 en los cerdos.

VIA Y VOLUMEN DEL SANGRADO

Los cuyes se sangraron por punción intracardiaca realizando asepsia del área precordial con una torunda impregnada de alcohol, la sangre se recolectó en tubos Vacutainer ^{MR} obteniendo 1 ml por toma.

De los cerdos la muestra se tomó de la vena yugular obteniendo 3 ml por toma. Después de la punción se les aplicó un desinfectante y compresión digital con una torunda seca hasta detener el sangrado.

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

El tubo colector con la muestra sanguínea se inclinó a 45° hasta que se coaguló y se procedió a la remoción del coágulo en forma estéril al separarse del suero; los tubos se colocaron en una centrífuga a 2,000 rpm durante 10 minutos, tomándose posteriormente los sobrenadantes (sueros) que fueron inactivados en baño maría a 56°C durante 30

minutos. Después se colocaron en un congelador a -20°C hasta que se colectó la totalidad de las muestras.

Una vez obtenidas todas las muestras los sueros fueron tratados para eliminar posibles inhibidores inespecíficos de la siguiente manera: en tubos de ensayo se colocaron de cada suero 200 μl de este más 200 μl de caolín y 200 μl de eritrocitos de cuye al 5%, se mezclaron ligeramente hasta quedar uniformes y se dejaron 24 horas en refrigeración a 4° Celsius, posteriormente se centrifugaron a 500 rpm durante 10 minutos, se obtuvo el sobrenadante (suero) y se colocó en placas de 96 pozos con fondo en "V" para facilitar el trabajo.

PRUEBA DE INHIBICION DE LA HEMOAGLUTINACION (IHA)

La prueba se corrió en placas de 96 pozos con fondo en "V" utilizando diluciones dobles desde 1:6 hasta 1:986. Con los siguientes testigos: suero positivo, suero negativo glóbulos rojos de cuye al 0.75% y del virus de ojo azul diluido a 8 UHA, además se retituló el virus utilizado, Se tomaron como positivos los sueros con un título 1:16 y negativo menor a este título, haciéndose 3 lecturas a los 20, 40 y 60 minutos.

Procedimiento:

- 1.- Se colocaron 50 μl de solución buferada de fosfatos (PBS) en cada uno de los pozos de la placa.
- 2.- Se colocaron 50 μl del suero problema en los pozos de la primera fila (1-12).

- 3.- Con una multipipeta se diluyeron los sueros problema (diluciones dobles) tomándose 50 μ l de cada pozo (AH).
- 4.- Se desechó lo que quedó en la última dilución (50 μ l).
- 5.- Se pusieron 50 μ l por pozo del antígeno (POA) a 8 unidades hemoaglutinantes (UHA) en toda la placa incluyendo los testigos positivo, negativo y de virus.
- 6.- Se dejaron las placas a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- 7.- Se aplicaron en cada pozo 50 μ l de eritrocitos de cuyo al 0.75% en toda la placa. Incluyendo el testigo de eritrocitos.
- 8.- Se dejaron las placas a temperatura ambiente hasta que empezaron a hacerse manifiestos los botones de sedimentación del control de eritrocitos (aprox. entre 20 y 30 minutos).
- 9.- Se realizaron las lecturas.

PRUEBA DE LA INHIBICION DE LA HEMOAGLUTINACION MAS MERCAPTOETANOL

Se prepararon 3 placas de 96 pozos con fondo en "V" colocándose en cada una los sueros previamente preparados con tres diferentes molaridades de mercaptoetanol (0.1, 1.0 y 2.0 Molar) en proporción de 1:5 (25 μ l de mercaptoetanol y 100 μ l de suero). En seguida se colocaron en una plancha agitadora-mezcladora durante 2 horas.

Procedimiento de la prueba:

- 1.- Se colocaron 50 μ l de solución buferada de fosfatos (SBP) en cada uno de los pozos de la placa.

2.- Se colocaron 50 μ l del suero preparado con mercaptoetanol al 0.1 M en los pozos de la primera fila.*

3.- Se continúa con los mismos pasos de la prueba de IHA estándar (paso 3 en adelante).

* NOTA: Se realizaron los mismos pasos para repetir el experimento con el suero preparado con mercaptoetanol al 1 M y al 2 M.

METODO ESTADISTICO

Se calculó la estadística descriptiva de las variables en estudio por animal y por tratamiento.

Se utilizó un diseño de bloques completos al azar y su análisis de la varianza utilizando el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS (que basa su solución en el método de cuadrados mínimos) para probar diferencias entre animales (cuyes y cerdos, según el caso) y los tratamientos (testigo, 0.1M, 1M y 2M).

RESULTADOS

En la semana 1 existe un título de la inhibición de la hemaglutinación (IHA) bastante bajo para los tres cerdos. En la semana 2 los niveles de anticuerpos fueron 1:192 para los tres cerdos y al manejar las diferentes molaridades en general se observó un descenso en el título de anticuerpos. Debido a la gran variación entre cerdos no es posible detectar diferencias en el tiempo a partir de la tercera semana (Cuadro 1).

El análisis de la varianza del diseño de bloques completos al azar permitió observar diferencias entre molaridades al contrastar al testigo con el 2M y al 0.1M con el 2M ($p < 0.05$) Cuadro 2

En el Cuadro 3 aparecen los promedios y las desviaciones estándar para cada uno de los cerdos y encontramos en general diferencias importantes entre ellos.

En ambas especies al observar los valores obtenidos en las diferentes molaridades (Testigo, 0.1 M, 1 M y 2 M) se presentó una disminución en los títulos de anticuerpos.

En cuanto a los cuyes, en la primera semana se observaron resultados serológicos negativos excepto en el cuye 3. A partir de la semana 2 los cuyes presentaron una respuesta serológica muy variable (cuadro 4) y-en el análisis de la varianza-(cuadro 5) precisamente esta gran variabilidad no permitió observar diferencias entre los tratamientos (diferentes molaridades y testigo) ($p > 0.05$).

En el Cuadro 6 aparecen los promedios y las desviaciones estándar para cada uno de los cuyes y encontramos diferencias importantes entre los mismos.

DISCUSION

Al inocular a los cerdos con el antígeno de Ojo Azul es de esperarse que éstos generen una respuesta a través del tiempo. Los resultados de este estudio evidenciaron que la respuesta individual es muy irregular.

Las diferencias observadas entre tratamientos sustentan la hipótesis de que es posible detectar diferencias entre infecciones recientes con respecto a las viejas, pero sólo en el cerdo y sólo al comparar el grupo testigo y al 0.1M con el 2M.

La concentración 2M tuvo un efecto que nulificó en algunos casos totalmente (cerdo 2) la detección de anticuerpos a pesar de haber transcurrido más de un mes de la inoculación. Esto indica que muchas de la IgG también fueron desnaturalizadas, por tal motivo su coeficiente de variación es tan elevado.

La diferencia entre los cerdos puede estar dada por la idiosincrasia de cada uno a pesar de tratarse de animales de la misma edad, peso y de ser mantenidos en las mismas condiciones y por causas desconocidas no controladas.

Era de esperarse que existiera una diferencia significativa entre los tratamientos con relación a los sueros sin mercaptoetanol dado al efecto que tiene éste en las IgG producidas en las infecciones recientes. Sin embargo estadísticamente no existió diferencia entre las soluciones .1M, 1M y los sueros no tratados o testigos

($P > 0.05$). Esto puede deberse fundamentalmente a que el número de observaciones en el experimento es muy bajo, lo que origina que los errores estándares sean amplios.

En los cuyes pudo observarse una gran heterogeneidad. circunstancia que no permite probar diferencias estadísticas entre tratamientos (diferentes molaridades y testigo) aunado al tamaño de muestra tan reducido. A los resultados, no obstante, puede atribuirse también una respuesta inespecífica del suero de cuyes, a los diferentes tratamientos con el mercaptoetanol.

CONCLUSIONES

De los animales utilizados en esta prueba cuyes y cerdos se observó que en los cuyes no se obtuvieron los resultados que se esperaban por ser posiblemente una especie heteróloga al virus de Ojo Azul (POA. Por lo que se puede observar que desde un inicio no se pueda detectar una variabilidad en su respuesta inmune

Sin embargo en el cerdo se observó una respuesta mayor a la generación de anticuerpos.

Las diferencias observadas entre tratamiento afirman la hipótesis de que es posible detectar diferencias entre infecciones recientes con respecto a las anteriores que hubieran padecido los animales, pero sólo en el cerdo al utilizar la concentración 2 molar, lo que nos indica que esta dilución es la adecuada.

LITERATURA CITADA

1.- Argate. M.; Hernán. F. y Sena. A.: La prueba del mercaptoetanol en el diagnóstico de brucelosis porcina. Cienc. Tec. Agric. 2:47-53 (1980).

2.- Bowman y Rand: Farmacología, bases bioquímicas y patológicas. Interamericana. México, D.F., 13.1-13.10. (1984).

3.- Carreón, N.R.; Fuentes, R.M.; Stephano, H.A. y Ramírez, M.H.: Estudios preliminares del paramixovirus de ojo azul en la República Mexicana. Memorias del curso de actualización de enfermedades virales del cerdo. AMVEC México, D.F., 1989. 78-82. Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en cerdos, México, D.F. (1989).

4.- Carreón, N.R.: El síndrome de ojo azul. Síntesis porcina. 9: 60-62. (1990).

5.- Flores, J.J.; López, M.J. y Fuentes, R.M.: Resultados preliminares sobre la inoculación experimental del paramixovirus de ojo azul POA en el pecarí de collar Dicotyles tajacu. Tesis de licenciatura, Fac. de Med. Vet. y Zoot. UNAM, México, D.F. (1990).

6.- Galina, P.L.; Martínez, L.A.; Correa, G.P.; Colinas, T.A.; Aguilar, R.T. y Ramírez, N.R.: Transmisión experimental del paramixovirus porcino de La Piedad, Michoacán (Pp-lpm) en cerdos. Memorias de la XXIV Convención de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en cerdos. Morelia, Michoacán. 1989. p 84. Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en cerdos. México. D.F. (1989).

7.- Gay, G.M.: Pruebas de laboratorio para el diagnóstico de ojo azul. Memorias del curso de actualización de enfermedades virales del cerdo. México, D.F. 1989 83-84u. Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en cerdos. México, D.F. (1989).

8.- H.S. Joo, R.H. Johnson and D.L. Watson.: Serological procedures to determine time of infection of pig with porcine parvovirus. Aust. Vet. J., 54:125-26. March, (1978).

9.- Hedberg, G.; Reed, R.L. and Snyder, K.T.: Manual the diagnostic virology laboratory. National Veterinary Service Laboratories, AMES, IOWA. (1989).

10.- Marín, C.N.T.: Sondeo serológico de brucelosis en cuatro granjas porcinas mediante distintas pruebas diagnósticas. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. UNAM. (1980).

11.- Martínez, L.A.; Correa, G.P.; Rosales, E.F.; Vázquez, P.C. y Garibay, S.M.: Respuesta de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación contra el paramixovirus de ojo azul porcino de la Piedad, Michoacán en cerdos de diferentes edades. Memorias de la XXI Reunión Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. Puebla-Tlaxcala, 1986. 101-104. Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. México, D.F. (1986).

12.- Pérez, P.F.; Stephano, H.A. y Gay, G.M.: Estudios histológicos en lechones inoculados experimentalmente con el paramixovirus de ojo azul. Memorias del XXIII congreso de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en cerdos. León, Gto. 1988, 81-83. Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. México, D.F. (1988).

13.- Rosales, F.;Correa, P.: El síndrome del ojo azul. Primera parte. Avances 4: 99-102 (1990).

14.- Rosales, F.;Correa, P.: El síndrome del ojo azul. Segundaparte. Avances 5: 133-38 (1990).

15.- R. Montgomery; R.L. Pryer; T.W. Conway; A. A. Spector. Bioquímica médica. Salvat. México, D.F., 57,71-73,99 (1980).

16.- Stephano, H.A. and Gay, G.M.: Experimental studies on a new viral syndrome in pigs called 'blue eyes', characterized by encephalitis and corneal opacity. Proceeding of International Pig Veterinary Society 8th. Congress, Ghent, Belgium 1984, 71 inter. Pig. Vet. Soc. Ghent, Belgium (1984).

17.- Stephano, H.A.; Doporto, D.J.; y Gay, G.M.: Estudio epidemiológico en las granjas porcinas afectadas por el síndrome de ojo azul. Memorias de la reunión de investigación pecuaria en México. 1985, 93. SARH-UNAM, México, D.F. (1985).

18.- Stephano, H.A. y Gay, G.M.: Síndrome de ojo azul en cerdos. Síntesis porcina 4: 42-49, (1985).

19.- Stephano, H.A. y Gay, G.M.: El síndrome de ojo azul en cerdos de granjas engordadoras. Memorias de la XX Reunión Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. Mérida, Yucatán. 1985, 71-74. Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en cerdos, México, D.F. (1986).

20.- Stephano, H.A. y Gay, G.M.: Encefalitis, falla reproductiva y opacidad de la córnea en cerdos, síndrome del ojo azul, asociado a un paramixovirus. Estudio cronológico. Vet. Mex. 3:359-62 (1986).

21.- Stephano, H.A. y Gay, G.M.: Encefalitis, falla reproductiva y opacidad de la córnea, ojo azul. Síntesis porcina 5:26-39 (1986).

22.- Stephano, H.A. y Gay, G.M.: El síndrome de ojo azul. Una nueva enfermedad en cerdos asociada a un paramixovirus. Avances en enfermedades de cerdos :303-7 (1985).

23.- Stephano, H.A. y Gay, G.M.: El síndrome del ojo azul en cerdos. Vet. Mex. 17:120-22 (1986).

24.- Tizard, Ian.; Inmunología veterinaria.:
Interamericana. México, D.F., 45-63 (1985).

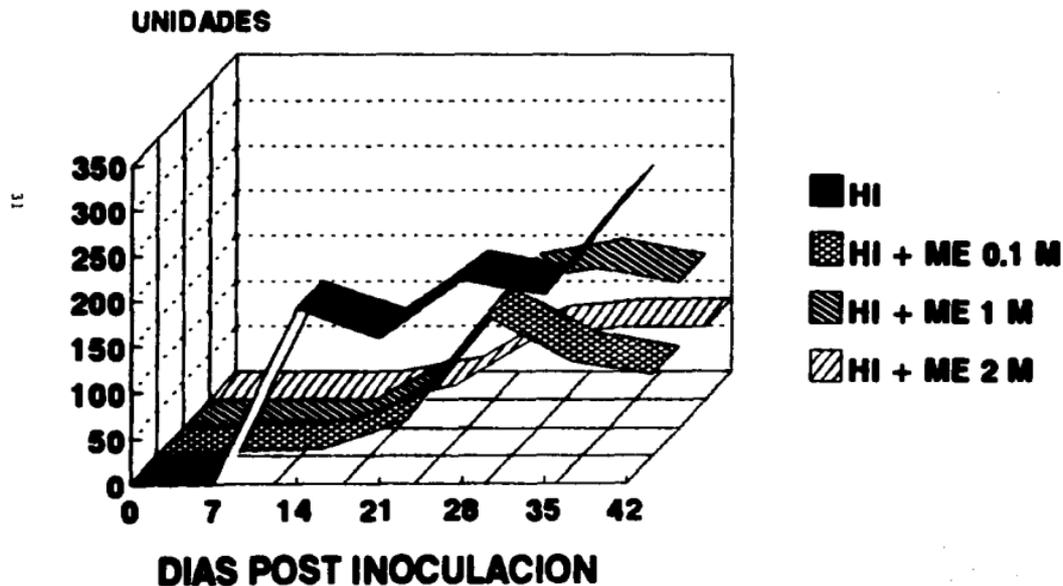
**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE INHIBICION DE LA HEMOAGLUTINACION (IHA) Y DE LA IHA MAS MERCAPTOETANOL EN CERDOS

ESPECIE	No. IDENTIFICACION	VA Y DOSIS	TOTAL MUESTRAS	SEMANA	HI	HMS 0.1 M	HMS 1 M	HMS 2 M
CERDO	8	IM 3 ml	8	1	0	0	0	0
				2	102	0	0	0
				3	102	24	40	24
		IN 3 ml		4	102	24	40	24
				5	102	00	00	40
				6	00	40	40	40
CERDO	7	IM 3 ml	8	1	0	0	0	0
				2	102	0	0	0
				3	00	40	40	0
		IN 3 ml		4	00	40	40	0
				5	40	24	40	0
				6	00	24	40	0
CERDO	8	IM 3 ml	8	1	0	0	0	0
				2	102	12	0	0
				3	102	40	40	24
		IN 3 ml		4	304	304	304	102
				5	304	102	304	102
				6	700	102	304	102

CUADRO # 1

INHIBICION DE LA HEMOAGLUTINACION VALORES COMPARATIVOS EN CERDOS



CUADRO 2
Análisis por Tratamiento en Cerdos

Tx	No. de Observaciones	Valor Máximo	Valor Mínimo	Media	Desviación Estándar
Tx1	18	8.58	0	4.86	1.9
Tx2	18	8.58	0	4.27	3.29
Tx3	18	6.58	0	2.48	2.91
Tx4	18	9.58	0	6.38	2.39

Tx= Tratamiento

Tx1= 0.1 Molar

Tx2 = 1.0 Molar

Tx3= 2.0 Molar

Tx4 = Testigo

CUADRO 3

Desviación Estandar de las Pruebas de IHA Normal en los Cerdos

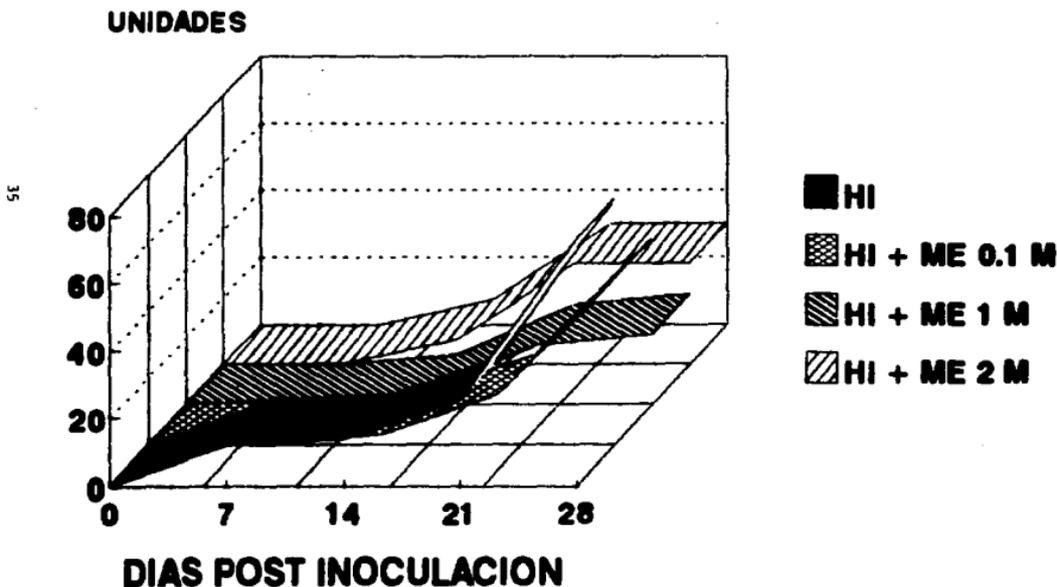
Especie	No. de Observaciones	Valor Máximo	Valor Mínimo	Media	Desviación Estándar
Cerdo 1	24	7.595	0	4.57	2.55
Cerdo 2	24	7.595	0	3.47	2.76
Cerdo 3	24	9.595	0	5.48	3.31

**RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE
INHIBICION DE LA HEMOAGLUTINACION
(IHA) Y DE LA IHA MAS MERCAPTOETANOL
EN CUYES**

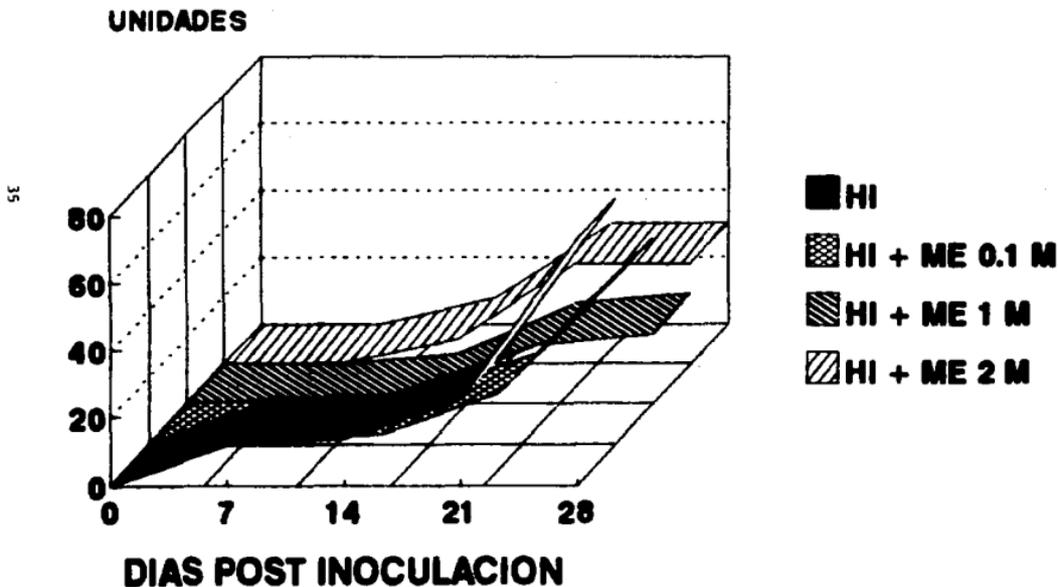
ESPECIE	NO. IDENTIFICACION	VA Y DOSIS	TOTAL MUESTRAS	SEMANA	HI	HIM 0.1 M	HIM 1 M	HIM 2 M
CUYE	1	IM 1 ml	4	1	0	0	0	0
				2	0	0	0	0
		IN 0.5 ml		3	0	0	12	24
				4	102	0	12	24
CUYE	2	IM 1 ml	4	1	0	0	0	0
				2	0	0	0	0
		IN 0.5 ml		3	48	6	12	24
				4	48	0	0	0
CUYE	3	IM 1 ml	4	1	48	0	0	0
				2	48	0	0	12
		IN 0.5 ml		3	48	24	24	48
				4	48	00	24	48
CUYE	4	IM 1 ml	4	1	0	0	0	0
				2	0	0	0	12
		IN 0.5 ml		3	0	0	0	0
				4	0	0	0	0

CUADRO # 4

INHIBICION DE LA HEMOAGLUTINACION VALORES COMPARATIVOS EN CUYES



INHIBICION DE LA HEMOAGLUTINACION VALORES COMPARATIVOS EN CUYES



CUADRO 5
Análisis por Tratamiento en Cuyes

Tx	No. de Observaciones	Valor Máximo	Valor Mínimo	Media	Desviación Estándar
Tx1	12	6,586	0	2	2,11
Tx2	12	4,565	0	1,87	2,02
Tx3	12	5,585	0	2,59	2,41
Tx4	12	7,558	0	3,42	3,07

Tx= Tratamiento

Tx1= 0.1 Molar

Tx2 = 1.0 Molar

Tx3= 2.0 Molar

Tx4 = Testigo

CUADRO 3
Desviación Estandar de las Pruebas de IHA Normal en los Cuyes

Especies	No. de Observaciones	Valor Máximo	Valor Mínimo	Media	Desviación Estándar
Cuye 1	12	6.563	0	2	2,11
Cuye 2	12	4.565	0	1.97	2,02
Cuye 3	12	5.565	0	2.59	2,41