

FALLA DE ORIGEN



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN



CURVA DE CRECIMIENTO DEL VIRUS VACUNAL PAV-250
CONTRA LA FIEBRE PORCINA CLASICA (FPC) EN
CELULAS DE RIÑON DE CERDO PK-15

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:
MARIA BEATRIZ ALONSO GUZMAN

A S E S O R E S :

M.V.Z. M.A. PABLO CORREA GIRON
M.V.Z. MARIA ANTONIA COBA AYALA



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA EL
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .



AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

"Curva de crecimiento del virus vacunal PAV-250 contra la

Fiebre Porcina Clásica (FPC) en células de riñón de cerdo

PK-15"

que presenta la pasante: María Beatriz Alonso Guzmán

con número de cuenta: 9242420-0 para obtener el TITULO de:
Médica Veterinaria Zootecnista

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 3 de febrero de 1975.

PRESIDENTE MSc. Pablo Correa Girón

VOCAL LVZ. Raúl A. Mar Cruz

SECRETARIO LVZ. Manuel Alvarez Trillanes

PRIMER SUPLENTE LVZ. Victor Quintero Ramirez

SEGUNDO SUPLENTE LVZ. Raúl Radillo Rodríguez

**A mis padres: Teófila y Jesús, con
eterna gratitud por todo el apoyo
que me brindaron para mi formación
profesional**

A mis hermanos: Fernando y Hugo

**A Alvaro: por todo el amor,
paciencia y apoyo que me has
dado**

AGRADECIMIENTOS

Al M.V.Z., M.A., Pablo Correa Girón por su asesoría en la elaboración de la presente tesis.

Agradezco especialmente a la M.V.Z. Ma. Antonia Coba Ayala por su valiosa e incondicional ayuda en la realización de esta tesis.

Al M.V.Z., M.C., Agustín Baez Ruiz por su asesoría y aportaciones hechas durante la realización de este trabajo.

Al M.V.Z. Arturo García Fraustro por su participación y por las facilidades prestadas durante la búsqueda bibliográfica.

Al Ing. José Luis Rincón Vázquez por su colaboración en la tipografía de la presente tesis.

Al M.V.Z. Esteban Labrandero Iñigo por las facilidades dadas para realizar la tipografía de esta tesis.

Al H. Jurado por la revisión y observaciones hechas a este trabajo.

Esta tesis fue realizada dentro del Proyecto Fiebre Porcina Clásica, en el Laboratorio de Virología, del Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología Veterinaria (CENID-MV), Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP), S.A.R.H., bajo la dirección del M.V.Z., M.A., Pablo Correa Girón y la M.V.Z. Ma. Antonia Coba Ayala.

INDICE

	PAGINA
RESUMEN	1
INTRODUCCION	3
OBJETIVOS	29
MATERIAL Y METODOS	30
RESULTADOS	47
DISCUSION	54
CONCLUSIONES	68
BIBLIOGRAFIA	81

RESUMEN

CURVA DE CRECIMIENTO DEL VIRUS VACUNAL PAV-250 CONTRA LA FIEBRE PORCINA CLASICA (FPC) EN CELULAS DE RIÑON DE CERDO PK-15.

Se prepararon 2 grupos de monoestratos de células PK-15 de dos días de edad en botellas de dilución de leche (DL). Una serie, integrada por 21 botellas, fue inoculada con 325 Unidades Formadoras de Focos Fluorescentes (UFFF) de la "cepa" vacunal PAV-250; y otra serie de 13 monocapas recibió 2,406 UFFF. Las botellas inoculadas se incubaron a 37°C durante diferentes períodos, y posteriormente permanecieron congeladas a -70°C hasta que fue titulado su contenido viral por la Técnica Directa de Anticuerpos Fluorescentes (TDAF), empleando monocapas de células PK-15 preparadas en tubos de Leighton que contenían laminillas, las cuales fueron inoculadas con diluciones logarítmicas desde 10^1 hasta 10^6 , preparados a partir de cada una de las botellas de DL. Después de 5 días de incubación a 37°C, las laminillas fueron teñidas por la TDAF con un conjugado específico para el diagnóstico de la FPC. El cálculo del título viral se hizo por el método de Reed y Muench, y con los resultados obtenidos se hicieron pruebas de correlación utilizando el paquete computacional Statistical Analysis System; cuando se inoculó con 325 UFFF, al determinar la correlación de los datos correspondientes a las fases de crecimiento logarítmico viral, de la hora 2 a la 6 $r = 0.77$; y de la hora 13 a la 18 $r = 0.73$; y cuando se inoculó con 2,406 UFFF, de la hora 1 a la 7 $r = 0.96$. Al inocular con 325 UFFF la fase de eclipse ocurrió a las 2 horas; la fase de crecimiento se presentó entre las 4 y 6 horas (con títulos de $10^{1.57}$ y $10^{2.63}$, respectivamente); y posteriormente los títulos descendieron

paulatinamente hasta las 10 horas (10^0); y desaparecieron de nuevo a las 12-13 horas; y aparentemente esto último ya perteneció a la fase de eclipse de un segundo ciclo de crecimiento viral, en el que se presentaron títulos más elevados entre las 14 a las 20 horas (fue de $10^{3.54}$ a las 18 horas). Al inocular con 2,406 UFFF, las diferentes etapas se notaron menos. Sin embargo, se detectó una fase de crecimiento que duró hasta las 7 horas ($10^{4.31}$), el primer ciclo viral terminó a las 10 horas ($10^{2.89}$); y el segundo terminó a las 21 horas ($10^{2.0}$); y de las 25 a las 121 horas se notó una declinación del título viral (de $10^{4.58}$ a $10^{1.37}$). Con base en los resultados obtenidos, se puede decir que hubieron mejores títulos virales al inocular con 2,406 UFFF que con 325 UFFF; y que dentro de las condiciones de este experimento, al inocular con 2,406 UFFF, el momento óptimo para la cosecha ocurrió entre las 24 y las 48 horas después de la inoculación de las células PK-15 con la "cepa" vacunal PAV-250.

INTRODUCCION

La Fiebre Porcina Clásica (FPC), es una enfermedad infectocontagiosa producida por un virus altamente transmisible y de rápida diseminación (22). El cerdo es el único hospedador natural y es la fuente más importante de difusión de la FPC (48); y en condiciones de campo se afecta el jaball (24); en condiciones de laboratorio se puede infectar al conejo, el borrego, la cabra, la ternera, el gato y el mono; unos investigadores mencionan que le dieron 57 pases al virus de FPC en ratón lactante y que el virus no perdió su virulencia para el cerdo (24). El agente causal es un virus que contiene ácido ribonucleico (ARN), de la familia Togaviridae, género Pestivirus, que se caracteriza por producir hemorragias generalizadas (55). Con base en su morfología y en el tipo de ácido nucleico, los Pestivirus mantienen una disposición de género, en la familia Togaviridae; recientemente, basándose en nuevos conocimientos en lo referente a su estrategia de replicación y organización del genoma, los Pestivirus fueron colocados dentro de la familia Flaviviridae (Horzinek, 1991; citado por Moennig, 1992) (45).

El virus es estable en un amplio rango de pH, pero se inactiva rápidamente con un pH abajo de 4 y con un pH arriba de 11 (Kubin, 1967; citado por Terspra) (61), sobreviviendo mejor en un pH de 4.8 a 5.1 (33), por lo que la acidez cadavérica no lo destruye (55). Sin embargo, la temperatura de 56°C lo inactiva en pocos minutos (55). Es estable y resistente a la mayoría de los desinfectantes (57). No resiste la luz solar, el hidróxido de sodio al 3% (durante 15 minutos), ni el fenol al 5% (durante 15 minutos) (24).

Desde el punto de vista geográfico, tiene una distribución mundial, aunque existen algunos países que se han declarado libres, tales como: Albania, Australia, Botswana, Canadá, Chipre, Finlandia, Gran Bretaña (Inglaterra, País de Gales, Escocia e Irlanda del Norte), Hungría, Irlanda, Islandia, Israel, Japón, Luxemburgo, Nueva Zelanda, Países Escandinavos (Dinamarca, Suecia y Noruega), Rumanía, Suiza, Túnez, y a partir de 1978 los Estados Unidos de Norteamérica (30, 48, 55). En México, a partir de la publicación en el Diario Oficial, del Acuerdo y Programa de la Campaña contra la FPC, el 25 de Marzo de 1980, se aplicaron programas anuales de vacunación en varias etapas, declarándose libres 58 municipios del norte de Sonora, el 10 de Enero de 1983 (13, 19). A partir de 1990 se reiniciaron los trabajos de erradicación y se han logrado liberar de FPC los Estados de Baja California, Baja California Sur; y el sur de Sonora (11 municipios) en 1991; Chihuahua y Sinaloa ingresaron a la etapa libre en 1993, y se logró incorporar a la fase de erradicación a Nuevo León y Yucatán en este mismo año (21, 22). Hasta septiembre de 1993, las zonas libres representaban el 32.06% del territorio nacional, el 13.7% de la población porcina y el 18.36% de la producción. Las zonas de erradicación representaban el 5.5% del territorio, el 4.0% de la población y el 4.3% de la producción (22). En 1994 se incluyen en la fase de erradicación a Campeche, Coahuila, Durango, Quintana Roo y Tamaulipas. Hay un programa de erradicación en la zona centro del país llamado Programa Regional para la Incorporación a la Fase de Erradicación de los Estados del Centro ¹. Desde 1993, los estados de Guanajuato, Jalisco, Michoacan, Queretaro, Puebla y Tlaxcala se encuentran en fase intensiva de la Campaña; así mismo se han llevado programas anuales de

¹ Dr. Assad Heneidi Zeckua, Subdirector de Epizootiología, Dirección de Campañas Zoonositarias, D.G.S.A., S.A.R.H., comunicación personal, Julio de 1994.

vacunación intensiva en los estados de Morelos, Hidalgo, México y San Luis Potosí; el resto de los estados se encuentran en etapa de control (21).

La FPC hasta hace pocos años se consideró en México, como un problema sanitario grave para la porcicultura nacional, tanto desde el punto de vista epizootológico, como por el impacto económico que ha representado (55). Durante y antes de los ochentas, se consideró como enzoótica, y en algunas regiones del país se convertía eventualmente en epizootica (55).

En el Cuadro 1 se puede observar que a partir de 1980 se ha notado una clara disminución del número de brotes de FPC comunicados a la D.G.S.A., S.A.R.H., conforme avanzaba el programa de la Campaña Nacional contra la FPC. En 1987 hubo un mínimo de 38 brotes; pero en los años siguientes estos brotes llegaron a incrementarse hasta la cifra de 380, en 1989; y nuevamente, al reiniciarse las acciones de la Campaña en 1991, han disminuido paulatinamente hasta llegar al mínimo de 8 brotes en 1993; y 3 brotes de Enero a Julio de 1994 (21) ².

² Dr. Arturo Cabrera Torres, Jefe de la Campaña Nacional contra la FPC, D.G.S.A., S.A.R.H., comunicación personal, Agosto de 1994.

CUADRO 1.- BROTES DE FPC COMUNICADOS DE 1980 A 1993, A LA DIRECCION GENERAL DE SALUD ANIMAL, S.A.R.H.

Año	Número de brotes	Año	Número de brotes
1980	625	1987	38
1981	250	1988	70
1982	170	1989	380
1983	180	1990	140
1984	160	1991	40
1985	80	1992	42
1986	40	1993	8

El comportamiento epizootiológico de la FPC en las piaras, corresponde a una enfermedad altamente transmisible, de rápida diseminación en los animales susceptibles, con morbilidad y mortalidad variables, dependiendo de la virulencia del agente causal y del grado de susceptibilidad de la piara afectada (55).

El contacto directo de un cerdo susceptible con otro infectado, es uno de los métodos más factibles para introducir la FPC en una piara (24, 33, 55, 57).

Bajo condiciones naturales, la infección por las rutas oral, a través de la mucosa bucal, y de las tonsilas, y respiratoria, son probablemente las más comunes (24, 57, 61). Los cerdos infectados pueden diseminar virus durante el período de incubación.

La movilización de los cerdos es la vía más común mediante la cual la FPC se difunde (61).

Esta enfermedad también se transmite en forma indirecta, cuando los cerdos son alimentados con desperdicios de la alimentación humana, que contenga vestigios de carne de cerdo (escamocha), sin procesar, cuando estos vestigios contienen el virus de FPC (55). El virus de la FPC puede sobrevivir en el cerdo y en productos procesados de cerdo. Esta sobrevivencia puede prolongarse por meses cuando la carne es almacenada en refrigeración o por años cuando es congelada (61). El virus puede también diseminarse a través de fomites, zapatos, vehículos de transporte, alimento, pájaros, insectos y otros artículos que se contaminen con el virus virulento; también puede llevarse a cabo la transmisión intrauterina o el contagio por medio de "portadores sanos o inaparentes" de la misma especie (22, 33, 55, 57). Sin embargo, Terpstra menciona que la transmisión por ropa contaminada, calzado, mascotas y roedores es rara, ya que las cantidades de virus así transferidas están usualmente por debajo de la dosis mínima infectante para cerdos (61).

La FPC puede tener un curso agudo, subagudo, crónico o ser clínicamente inaparente. Dependiendo de la virulencia de la "cepa" viral, la mortalidad puede ser de casi cero a virtualmente 100%. El cerdo es la única especie en que se sabe que ocurre naturalmente la enfermedad; cualquier raza y edad es susceptible, aunque los adultos tienen mejor probabilidad de sobrevivir a la infección. El brote natural de FPC puede también ocurrir en el cerdo salvaje (Sus scrofa ferus) (61).

Las "cepas" de campo del virus de FPC varían ampliamente en cuanto a su virulencia. Las "cepas" de alta virulencia producen la enfermedad aguda y alta mortalidad, mientras que las "cepas" de virulencia moderada generalmente dan lugar a infecciones subagudas o crónicas. La infección postnatal con virus de FPC de baja-virulencia da como resultado la enfermedad moderada o una infección subclínica. Sin embargo, tales "cepas" de baja-virulencia pueden producir mortalidad en fetos porcinos y lechones recién nacidos (48).

Las consecuencias de las infecciones producidas por el virus de FPC con "cepas" de virulencia moderada, son parcialmente determinadas por factores del hospedero, tales como: edad, inmunocompetencia, y condiciones nutricionales; en tanto que en el caso de infecciones por el virus de FPC altamente virulento o avirulento, los factores del hospedero parecen jugar un papel menor (48).

Las "cepas" virulentas usualmente se difunden más rápidamente en la piara e inducen más alta morbilidad, en comparación con las "cepas" menos virulentas (61). La infección con "cepas" virulentas da lugar al desarrollo de altos títulos de virus en la sangre y en otros tejidos. Grandes cantidades de virus son entonces excretadas en la saliva y cantidades menores en la orina, y en los fluidos nasales y lagrimales (Ressang, 1973) (61). La excreción viral continúa hasta la muerte, o en los cerdos que sobreviven, hasta que estos desarrollan anticuerpos (61).

Las "cepas" de moderada o baja virulencia pueden inducir infecciones crónicas, en las cuales el virus es diseminado continuamente o intermitentemente, hasta la muerte del animal (Mengeling y Packer, 1969); en las cerdas gestantes, la infección inicial a menudo es inaparente, pero el virus puede atravesar la barrera placentaria y llegar a los fetos (61). Algunos cerdos infectados con virus de FPC de baja virulencia han sobrevivido hasta por un total de 17 semanas y en algunos casos 21 semanas (19).

Se ha observado que el cuadro clínico y las lesiones producidas por la FPC han cambiado, especialmente en los países con producción porcina intensiva, en los que se han adoptado eficaces medidas de control y/o erradicación, ya que al lado de la forma aguda habitual, se observan formas crónicas y atípicas, a menudo con signos muy atenuados. Esta evolución ha complicado el diagnóstico y ha hecho más dificultosa la erradicación de la FPC en varios países (60).

Las lesiones se deben a que el virus daña el endotelio vascular, lo que provoca hemorragias e infartos en diferentes órganos (57). Las lesiones más comunes son: conjuntivitis; eritema; los ganglios linfáticos presentan Petequias, equimosis y están aumentados de volumen; hay amigdalitis; Petequias en epiglotis y epicardio; bronconeumonía, infartos y equimosis en pulmón; gastroenteritis hemorrágica; úlceras botonosas en el colon; Petequias e infartos en la mucosa de la vesícula biliar y vejiga urinaria, y en el riñón y bazo; congestión cerebral (19, 57); engrosamiento e irregularidad de la línea blanca del cartilago de las epífisis de los huesos, lo cual es notorio en la unión costochondral de las costillas (Dunne, 1975; citado por Van Oirschot, 1993) (48); Petequias y equimosis en las serosas torácicas y abdominales (19, 57).

Los principales signos clínicos que se manifiestan en la presentación aguda de la FPC son: fiebre de 41°C, o mayor, leucopenia, anorexia, pérdida de peso; los cerdos presentan debilidad, se muestran lentos e inactivos, postrados y agrupados; existe estreñimiento que puede alternar con periodos de diarrea; el vómito es común; lagrimeo y párpados pegados por presencia de secreción mucopurulenta; en los animales de piel blanca suele apreciarse eritema en la piel del vientre, orejas (especialmente en los bordes), cola, labios de la vulva y entrepiernas. Posteriormente se presentan trastornos respiratorios con abundante exudado nasal, tos y respiración agitada. En los estadios finales de la enfermedad se amontonan como si tuvieran frío y después se observan signos nerviosos, tales como incoordinación, parálisis de las extremidades (inicialmente las posteriores), y convulsiones antes de morir (55, 57). Los cerdos que sobreviven varias semanas, típicamente desarrollan signos de FPC crónica (19).

La forma crónica de la FPC se caracteriza por fiebre baja, leucopenia y un mejoramiento transitorio de la apariencia general, que es seguido por pérdida de apetito, depresión, diarrea, fiebre y muerte. La leucocitosis está frecuentemente asociada, en forma persistente, a esta presentación de la enfermedad (22).

Las lesiones en la FPC crónica se asemejan a aquellas que se ven en la forma aguda, pero usualmente son menos severas. Los cerdos crónicamente afectados con frecuencia mueren con pocas o sin hemorragias, muchas veces tienen abscesos en varios tejidos y ocasionalmente úlceras botonosas en el ciego o colon. A menudo se observa enteritis necrótica y bronconeumonía (19).

La forma crónica y/o "atípica" ocasionada por las "cepas" de baja virulencia del virus de la FPC, son de difícil diagnóstico (33). Estas son producidas por "cepas" que se han modificado en condiciones naturales, en el campo; o por "cepas" de origen vacunal (vacunas poco atenuadas) (30, 55). Estos cuadros clínicos se mencionan a continuación:

- Tremor Congénito tipo A-1 (30).

Conocido también como Mioclonia Congénita o Cerdos Brincadores o Cerdos Balladores; se manifiesta en los lechones al nacimiento, o pocas horas después. Se caracteriza por temblores de la cabeza, cuello, espalda y miembros posteriores; existe también debilidad, pocos deseos de alimentarse y pérdida del equilibrio. Colateralmente se ha observado momificación, micrognatia y ascitis. Este problema se ha observado asociado con la utilización de vacunas de virus vivo poco modificado aplicadas entre los 20 y 97 días de la gestación (30, 55, 57).

Cabe aclarar que el "Tremor Congénito" se refiere a los signos clínicos que pueden ser observados en los problemas hereditarios; intoxicación por el Neguvón (Metrifonato, Triclorfón), en hembras tratadas durante la preñez; e infecciones fetales producidas por el virus de la FPC, virus de la Encefalitis Japonesa o por el virus de la Pseudorrabia. Sin embargo, últimamente se ha observado que las historias clínicas de las piaras afectadas y las pruebas diagnósticas, indican que la mayoría de los brotes del "Tremor Congénito", son producidas por un agente infeccioso desconocido, que probablemente sea un virus (Bolin, 1992) (48).

- FPC aguda en los recién nacidos.

Se ha observado que cerdos recién nacidos, procedentes de madres no bien inmunizadas, o sin vacunar, pueden morir presentando la forma aguda de la FPC, sin que la enfermedad afecte a las cerdas. Los signos corresponden a una enfermedad muy similar, en sus características epizootológicas, a la FPC de curso agudo. Este problema se considera asociado a "cepas" no vacunales, de baja virulencia, que se supone infectan a la madre, sin producir signos de la enfermedad en ella, pero sí en los lechones (30, 55, 57).

- FPC en su forma aguda, transmitida por contacto con animales vacunados.

Se presenta en lechones provenientes de hembras no vacunadas, que tienen contacto con animales sanos, que fueron vacunados con productos elaborados con virus de FPC, activo, poco atenuado (30, 55, 57). Lo característico aquí es que sólo se afectan los animales jóvenes (30).

- FPC postvacunal de baja patogenicidad.

Al vacunar cerdos con vacunas modificadas, que recibieron pases en cerdas, las cuales conservan todavía parte de su virulencia, se ha observado que a los 10 a 15 días después de la vacunación, manifiestan signos de la enfermedad, que responden parcialmente a la antibioterapia, lo cual indica la existencia de complicaciones bacterianas. Aquí la mortalidad puede ser muy variable (30, 55), y generalmente es atribuible a las complicaciones bacterianas (30).

Todos estos cuadros clínicos son de difícil reconocimiento y requieren de técnicas precisas de diagnóstico, realizadas en laboratorios de diagnóstico especializados (2, 30, 51). Actualmente, la diferenciación entre los pestivirus de la FPC, Diarrea Viral Bovina (DVB) y Enfermedad de la Frontera (EF) y la diferenciación entre "cepas" virulentas de FPC, y "cepas" vacunales, puede hacerse utilizando anticuerpos monoclonales (48, 62).

En el campo, el diagnóstico clínico diferencial de la FPC ofrece grandes dificultades, ya que puede ser confundida con enfermedades de muy variada etiología. Entre las principales enfermedades producidas por virus, que entran en el diagnóstico diferencial con la FPC, están: la Peste Porcina Africana (PPA), Enfermedad de Aujeszky, Síndrome del Ojo Azul, otras Encefalitis Virales y ciertas alteraciones patológicas de los sistemas nervioso y muscular (Cuadro 2); entre las enfermedades bacterianas septicémicas ("enfermedades rojas"), están: la Salmonelosis septicémica, la Erisipela aguda y la Pasteurellosis aguda, que son con las que más se puede confundir la FPC. Si hay abortos, hay que diferenciar con la Enfermedad Misteriosa del Cerdo (PRRS-SIRS) (10, 52), Brucelosis, Leptospirosis, Pseudorrabia, Parvovirus e infecciones por Enterovirus Porcinos. Son de importancia también la Toxoplasmosis, de etiología parasitaria, que puede producir signos respiratorios, digestivos, nerviosos y reproductivos en los cerdos; y la Intoxicación por sal, que también produce signos nerviosos (2, 19, 24, 30, 48, 55, 57).

El virus de la FPC puede multiplicarse en cultivos celulares procedentes de diferentes mamíferos (50); especialmente en los de origen porcino (60); para ello, se pueden utilizar cultivos primarios, de bazo, riñón, médula ósea, testículo, ganglio linfático,

CUADRO 2.- ALTERACIONES PATOLOGICAS DE LOS SISTEMAS NERVIOSO Y MUSCULAR (12).

Edad en que se inicia/ Nombre o causa	Principales signos clínicos iniciales					
	I	II	III	IV	V	VI
Al nacimiento						
Artrogriposis		+				
Malformación cerebral	-/+	=	+/-	+/-	+/-	+/-
Defecto motor congénito		(+)	+	-/+		
Tremor congénito		-/+	+	+		-/+
Malformación espinal		+	+	-/+		
Hipertrofia muscular congénita	-	-	+/-	-	-	-
Piernas abiertas		+	=			
Def. Vit. A (maternal)		+	+	+/-		+
≤ 2 semanas						
Ojo Azul	-/+	+	+	-/+	-/+	+
Virus hemaglutinante encefalomielitis		+	+		-/+	
Intoxicación por hierro		+				
≥ 2 semanas						
Pseudorabia	+	+	+	+/-	-/+	+/-
Peste Porcina Africana	-/+	+/-	+	-/+		
Meningitis bacteriana	-/+	-/+	+	-/+	+/-	
Deficiencia de cobre		+	+			
Enterovirus:						
Teschen/Talfan	+/-	+	+	+/-	-/+	-/+
Otras	-/+	+	+			
FPC	-/+	+	+	-/+	-/+	-/+
Sin. "Pietrain creeper"		+	+	+/-		
Tétanos	-/+	+	±/+	-/+		(+)
Escl. cerebro-cortical		-/+	+	-/+	+/-	?
Angiopatía cerebroesp.	+/-	-/+	+/-	-/+	+/-	+
Enfermedad del edema		+	+	+/-		-/+

I = Excitación motora; II = Paresia/parálisis; III = Ataxia; IV = Tremor; V = Síndrome vestibular, y VI = Visión defectuosa; (+) = Regularmente presente; (-/+) = Ocasionalmente presente; (+/-) = Inconstantemente presente; (=) = Leve/mínimo; ? = Dudoso/ equivoco; y () = Secundario.

CUADRO 2 (CONTINUACION).- ALTERACIONES PATOLOGICAS DE LOS SISTEMAS NERVIOSO Y MUSCULAR (12).

Edad en que se inicia/ Nombre o causa	Región afectada				
	VII	VIII	IX	X	Otras
Al nacimiento					
Artrogriposis		+	+	(+)	Articulaciones
Malformación cerebral	+		(+)		Ojos
Defecto motor congénito	+				
Tremor congénito	+	+			
Malformación espinal		+	+/-	(+/-)	
Hipertrofia muscular congénita	-	-	-	+	
Piemas abiertas		?	?	?	
Def. Vit. A (maternal)	+	+	(+)	(+)	
≤ 2 semanas					
Ojo Azul	+	?			Ojos
Virus hemaglutinante encefalomielitís	+	≈			
Intoxicación por hierro				+	Corazón
≥ 2 semanas					
Pseudorrabia	+	≈	≈		Respiratorio
Peste Porcina Africana	+	≈	≈		L-R
Meningitis bacteriana	+	+			Articulaciones, corazón
Deficiencia de cobre		+	+	(+)	
Enterovirus:					
Teschen/Talfan	+	+	(+)	(+)	
Otras	+	+	(=)	?	
FPC	+	≈	?	?	L-R
Sín. "Pietrain creeper"				+	
Tétanos	≈	≈	≈	+	
Escl. cerebro-cortical	+				
Angiopatía cerebroesp.	+	+			
Enfermedad del edema	+	≈			Intestino, sist. vascular

VII = Cerebro; VIII = Médula espinal; IX = Sist. Nerv. Periférico; X = Músculo; L-R = Sistema Unforreticular; (+) = Regularmente presente; (-/+) = Ocasionalmente presente; (+/-) = Inconstantemente presente; (≈) = Leve/mínimo; ? = Dudosos/ equivoco; y () = Secundario.

CUADRO 2 (CONTINUACION).- ALTERACIONES PATOLOGICAS DE LOS SISTEMAS NERVIOSO Y MUSCULAR (12).

Edad en que se inicia/ Nombre o causa	Principales signos clínicos iniciales					
	I	II	III	IV	V	VI
Encefalomalacia	-/+		+/-	-/+		-/+
Enf. del oído medio			+		+	
Intox. arsénico org.	-/+	+	+	+		+
≥ 6 semanas Intox. mercurio org.		+	+			+
Neurot. organofosforados		+	+	-/+		
Def. ácido pantoténico		-/+	+			
Rabia	+	+	+	-/+	-/+	-/+
Envenenamiento con sal/Privación de agua	+	+/-	+	+/-		+/-
Enf. Vesic. del Cerdo	+/-		+			
Larva migrans visceral	-/+	-/+	+		-/+	-/+
Deficiencia de Vit. A		-/+	+/-		+	
≥ 3 meses Síndrome de asimetría de cuartos traseros			-/+			
Necr. músc. dorsales		+	-/+			
Tembler del Landrace			-/+	+		
Miopatía nutricional		+				
Enf. o trauma vertebral		+	+			
Año Mionecrosis clostridial		≈				
Neoplasia	?	?	?	?	?	?
Síndrome del "stress" porcino		≈				
Sólo adultos Encefalopatía espongiforme subaguda						

I = Excitación motora; II = Paresia/parálisis; III = Ataxia; IV = Tremor; V = Síndrome vestibular; y VI = Visión defectuosa; (+) = Regularmente presente; (-/+) = Ocasionalmente presente; (+/-) = Inconstantemente presente; (≈) = Leve/mínimo; (? = Dudosos/ equivoco; y () = Secundario.

CUADRO 2 (CONTINUACION).- ALTERACIONES PATOLOGICAS DE LOS SISTEMAS NERVIOSO Y MUSCULAR (12).

Edad en que se inicia/ Nombre o causa	Región afectada				
	VII	VIII	IX	X	Otras
Encefalomalasia	+				
Enf. del oído medio	+				
Intox. arsénico org.	+	+	+	(?)	
≥ 6 semanas					
Intox. mercurio org.	+	≈			
Neurot. organofosforados	≈	+	+	(+)	
Def. ácido pantoténico		+	+	(+)	
Rabia	+	≈			
Envenenamiento con sal/Privación de agua	+				
Enf. Vesic. del Cerdo	+	≈			Piel
Larva migrans visceral	+	+			Visceras
Deficiencia de Vit. A	+	≈			
≥ 3 meses					
Síndrome de asimetría de cuartos traseros				+	Grasa, hueso
Necr. músc. dorsales				+	
Tembler del Landrace	?				
Miopatía nutricional				+	Corazón
Enf. o trauma vertebral		+	(+)		Hueso, articulaciones
Año					
Mionecrosis clostridial				+	
Neoplasia	?	?	?		
Síndrome del "stress" porcino				+	Corazón
Sólo adultos					
Encefalopatía espongiiforme subaguda	?	?			

VII = Cerebro; VIII = Médula Espinal; IX = Sist. Nerv. Periférico; X = Músculo; L-R = Sistema Linforreticular; (+) = Regularmente presente; (-/+) = Ocasionalmente presente; (+/-) = Inconstantemente presente; (≈) = Leve/mínimo; ? = Dudoso/ equivoco; y () = Secundario.

leucocitos y células embrionarias de piel (57); también pueden crecer en líneas celulares (41). Las "cepas" del virus de FPC no suelen producir ningún efecto citopatogénico (ECP), cuando se multiplican en cultivos celulares (38, 60). Sin embargo, se sabe de algunas "cepas", tales como la PAV-1 (38, 42) y la "Cepa" A (15), que pueden producir ECP. Esto también se ha visto con la "Cepa" PAV-250 al ser inoculada sin diluir³.

Existen varias pruebas de laboratorio para confirmar el diagnóstico de la FPC y una de ellas es la Prueba Directa de Anticuerpos Fluorescentes (AF), realizada con tejidos infectados, o con cultivos celulares previamente inoculados. La técnica de AF es sensible, específica y precisa, para detectar reacciones antígeno-anticuerpo (1, 18); se trata de una técnica rápida para identificar la presencia de una gran variedad de antígenos (18). La técnica de inmunofluorescencia (IF), consiste en poner de manifiesto la presencia de antígenos, presentes en tejidos de animales sospechosos ó enfermos y en los cultivos de células infectadas por un virus; la técnica de seroneutralización, basada en la reducción de focos fluorescentes, también sirve para poner de manifiesto la presencia de anticuerpos en los sueros de animales enfermos, o en los sanos que se han recuperado de la enfermedad y/o en los que han sido inmunizados previamente (18). Si se utiliza un colorante fluorescente (fluorocromo), v.g. isotiocianato de fluoresceína, y se conjuga con las moléculas de anticuerpos, tales anticuerpos marcados, pueden ser usados para localizar e identificar la presencia del antígeno viral homólogo en las células infectadas. Este

³ Dr. Pablo Correa Girón, Jefe del Proyecto FPC, CENID-MV, INIFAP, SARH, comunicación personal.

procedimiento es llamado "IF Directa". La presencia del antígeno se hace visible al extirar el fluorocromo con la luz ultravioleta de un microscopio de fluorescencia (54).

En los E.U.A., Solórzano (1962) fue el primero en aplicar la técnica de inmunofluorescencia al virus de la FPC (59). Carbrey, en 1965, perfeccionó esta técnica y la aplicó en la titulación, para la determinación del número de células, o de focos de células fluorescentes, en cultivos celulares; encontrando que 24 horas después de la infección del monoestrato de células PK-15, con diluciones logarítmicas de virus de la FPC, utilizando el microscopio de luz ultravioleta, se pueden contar los focos fluorescentes, constituidos por 20 a 30 células infectadas (4). Estos focos fluorescentes también pueden estar constituidos por una célula aislada, o por grupos de células infectadas (18). De esta manera se puede expresar el título infectante de una suspensión viral, con base en el número de unidades formadoras de placas fluorescentes, o sea de unidades formadoras de focos fluorescentes (UFFF) (4). Esta técnica también tiene la ventaja de poder identificar y titular, en un mismo sistema, a los virus virulentos y los atenuados. Se obtienen resultados satisfactorios con los virus virulentos y con la mayoría de los virus atenuados por pases en cultivos celulares, los cuales provocan una fluorescencia generalmente intensa y precoz. Por el contrario, con los virus que han sido modificados mediante pases en conejos ("cepa" China), y con las "cepas" de baja virulencia encontradas en el campo, es muy difícil de apreciar la fluorescencia específica, dado que estos virus se multiplican lentamente en los cultivos celulares, y en estos casos la fluorescencia es de baja intensidad y tarda en aparecer, sobretodo en el primer pase. Por lo que es recomendable hacer varios pases seriados, en cultivos celulares, para poder identificar la presencia del virus (4).

Al intentar el aislamiento del virus en cultivos celulares, se puede emplear la inmunofluorescencia directa, para detectar la presencia del antígeno viral, la cual constituye una de las mejores pruebas para detectar la presencia del mismo en los tejidos. Este método de detección del antígeno en los cultivos celulares, permite revelar pequeñas cantidades de antígeno viral; y por consiguiente, es ligeramente más sensible para detectar el antígeno en los tejidos, que la aplicación de la inmunofluorescencia directa a las secciones congeladas de tejidos infectados; la eficiencia de este método ha sido estimada en un 89%, al comparar los resultados con los obtenidos por inoculación en cerdos (60). Aquí se hace necesario mencionar la importancia de la técnica de Exaltación del ECP del virus de la Enfermedad de Newcastle (EVENC). Pues esta técnica ha contribuido no sólo al diagnóstico de la FPC, sino también al desarrollo de vacunas de virus vivo y a estudios sobre la multiplicación viral. A través de estudios comparativos, se ha observado que no hay grandes diferencias en los títulos virales determinados por la prueba de EVENC y la prueba de AF. Se probó que ambos métodos fueron muy útiles para la detección y titulación del virus de FPC. La técnica de AF, cuando se realiza en cultivos celulares, tiene ventajas, por su rapidez y simplicidad; el conteo de placas en esta prueba es preciso, más fácil y requiere de menos tiempo (41). Sin embargo, cuando se tienen que titular muchas muestras de virus, o cuando se tienen que detectar anticuerpos en una gran cantidad de sueros, parece ser que la prueba de EVENC puede ser más favorable que la de AF (41).

El virus de la FPC puede ser propagado en cultivos celulares de riñón de cerdo, de los cuales las más usadas son la línea celular PK-15 y la SK-6. La replicación viral ocurre

únicamente en el citoplasma celular, y el virus no causa efecto citopático; y se desarrolla en cualquiera de las dos líneas celulares a través del medio de cultivo, cuando el virus sale de la célula infectada, o directamente de célula a célula, pasando por los puentes citoplásmicos, o al ocurrir la división celular, puede pasar de las células madres a las células hijas; de esta forma la infección continua de los cultivos celulares se establece fácilmente (48, 61). El virus parece madurar en la membrana intracitoplasmática, lo cual está de acuerdo con la incapacidad para detectar antígenos virales de FPC en la superficie de las células infectadas (Van Oirschot, 1980) (48). La primera progenie del virus se libera de las células a las 5-6 horas post-infección. Bajo condiciones de un solo ciclo de crecimiento, hay un incremento exponencial en el título del virus hasta las 15 horas postinfección, tras lo cual la producción del virus continúa aumentando hasta un nivel más alto por varios días (48).

Se ha demostrado que el virus de la FPC puede multiplicarse en cultivos celulares procedentes de diferentes mamíferos (suinos o no suinos) previamente inoculados con el virus de la FPC ("cepa" virulenta Ames; y "cepa" Monovet, modificada en cultivos celulares). Las especies de las que se obtuvieron estos cultivos celulares correspondieron tanto a mamíferos terrestres (Cuadros 3 y 4), así como a los más exóticos mamíferos marinos (50). En un experimento realizado por Lin *et al* (41), se hizo la comparación entre varios tipos de cultivos celulares para encontrar los más adecuados para la detección y titulación del virus de la FPC, por la técnica de AF. Se compararon 4 tipos de cultivos celulares: línea celular de riñón de cerdo (PK-15), células primarias de riñón de cerdo (SK), células primarias de testículo de cerdo (ST) y la línea celular de riñón embrional de cerdo (ESK). El resultado

CUADRO 3.- CULTIVOS CELULARES PRIMARIOS DE MAMIFEROS SUSCEPTIBLES AL VIRUS DE LA FPC, AL SER INOCULADOS CON EL VIRUS VIRULENTO AMES (VVA) Y CON UN VIRUS MODIFICADO EN CULTIVOS CELULARES (VMCC*) (50).

Origen del tejido	Orden, género y especie	Susceptibilidad a	
		VVA	VMCC
Riñón embrional de bovino (EBK)	ARTIODACTYLA Bos taurus	1+	3+
Riñón de cordero (LK)	Ovis aries	1+	2+
Riñón de cabra (GK)	Capra hircus	2+	3+
Riñón de venado cola blanca (WTDK)	Odocoileus virginianus	1+	4+
Riñón de cerdo doméstico (PK)	Sus scrofa	5+	5+
Riñón de pecari de collar (PEK)	Tayassu tajacu	3+	4+
Riñón de zorrillo listado (SKK)	CARNIVORA Mephitis mephitis	2+	2+
Riñón de tejón americano (BAK)	Taxidea taxus	1+	2+
Riñón de ardilla zorra (SQK)	RODENTIA Sciurus niger	2+	3+
Riñón de cuy (GPK)	Cavia porcellus	1+	2+
Riñón de conejo doméstico (RKD)	LAGOMORPHA Oryctolagus cuniculus	1+	2+
Riñón de conejo cola de algodón del este (RKC)	Sylvilagus floridanus	2+	2+

*"Cepa" Monovet; 1+, una que otra célula infectada; 2+, pequeñas placas de 5-15 células infectadas; 3+, al menos 50% de la monocapa celular infectada; 4+, al menos 75% de la monocapa celular infectada; y 5+, toda la monocapa infectada.

CUADRO 4.- CULTIVOS CELULARES PRIMARIOS DE MAMIFEROS, NO SUSCEPTIBLES AL VIRUS DE LA FPC, AL SER INOCULADOS CON EL VVA Y CON EL VMCC (50).

Origen del tejido	Orden, género y especie	Susceptibilidad a	
		VVA	VMCC
Riñón de perro (Cachorro de granja) (DFK)	CARNIVORA Canis familiaris	0	0
Riñón de perro (Beagle) (DFB)	Canis familiaris	0	0
Riñón de hurón de patas negras (FK)	Mustela nigripes	0	0
Riñón de zorra roja (RFK)	Vulpes fulva	0	0
Riñón de mapache (RAK)	Procyon lutor	0	0
Riñón de rata (Wistar) (RKW)	RODENTIA Rattus norvegicus	0	0
Riñón de ratón (Webster) (MKW)	Mus musculus	0	0
Riñón de mono verde africano (AGMK-1)	PRIMATE Cercopithecus aethiops	0	0
Riñón de mono verde africano (AGMK-2)	Cercophilecus aethiops	0	0
Riñón de mono Rhesus (RMK)	Macaca mulatta	0	0
Riñón de embrión humano (EHK)	Homo sapiens	0	0
Riñón de zarigüeya americana del norte (OPK)	MARSUPIALIA Didelphis marsupialis virginiana	0	0

0 = No hubo células infectadas.

de este estudio fué que en los cultivos de células PK-15 se produjo fluorescencia más clara y un mayor título viral (41). Sin embargo, se ha demostrado que los cultivos de leucocitos son ligeramente más sensibles que las líneas celulares, a la inoculación con pequeñas cantidades de virus (60); pero al parecer no hay diferencia en el tiempo que tarda en aparecer el antígeno, ya que todos los tipos celulares inoculados (PK-15, SK, ST y ESK) fueron positivos, después de 24 horas de incubación. El tiempo óptimo para el conteo de las placas fluorescentes varió entre 24 y 48 horas después de la inoculación, para los virus virulentos; y de 24 horas para los virus adaptados a cultivos celulares; hubo correlación entre la dosis y la respuesta, en el conteo de placas fluorescentes, ya que el número de placas siempre disminuyó paralelamente a la dilución empleada de los virus estudiados (41).

En 1968, Aynaud realizó un estudio, en el cual se observaron 3 fases en la replicación de una clona del virus de FPC en células PK-15 (3). Las titulaciones se hicieron por la técnica de AF, las cosechas fueron obtenidas cada hora, durante las 10 primeras horas, y después cada 3 ó 4 horas. La multiplicación del virus, a 37°C, mostró las siguientes características:

1) Fase de latencia.

El título infeccioso bajó a partir del momento de la infección, para alcanzar el mínimo aproximadamente a la quinta hora. Durante este período principia la síntesis de los diversos constituyentes del virus.

2) Fase de crecimiento exponencial.

A partir de la quinta hora se observa un aumento rápido del título viral, correspondiendo a la liberación de viriones recientemente formados. La aparición de nuevos

viriones se efectúa de manera logarítmica hasta la hora 15, que es cuando se observa un cambio en la pendiente de la curva. Estos resultados permiten interpretar, que el ciclo de producción viral propiamente dicho, terminó alrededor de la hora 15. El ciclo del virus de la FPC es relativamente largo.

3) Fase de producción viral continua.

Alrededor de la hora 15, se observa un cambio en la pendiente de la curva, pero todavía con aumento del título viral, hasta la hora 50 aproximadamente. Lo cual indica una producción continua del virus por parte de las células infectadas. En ese momento se obtiene generalmente un título viral máximo de 10^7 a 10^8 UFFF/ml. Con la clona estudiada por Aynaud (3), la producción de este virus se prolongó durante muchos días, después de la infección de las células. Esta clona se multiplicó intensamente en la célula huésped, sin causarle daños que ocasionaran la aparición de efecto citopático, o que pudieran detener la multiplicación de las células infectadas. La síntesis de virus se efectuó de manera continua a partir de las células infectadas, las cuales todavía podrían aumentar en número si las condiciones lo permitían. Y se presentó un equilibrio entre la síntesis viral y la síntesis celular (3).

Otros investigadores obtuvieron resultados promisorios en el desarrollo de una vacuna inactivada de FPC. El virus de FPC fue multiplicado en células PK-15, concentrado e inactivado con glicilaldehído y después fue mezclado con un adyuvante oleoso. La inoculación de 5 ml de esta vacuna indujo una sólida inmunidad, de larga duración (46).

En México se han realizado estudios con una vacuna para controlar la FPC, modificada en cultivos celulares; se trata de la vacuna de virus vivo modificado, "cepa"

PAV-250, que ha sido elaborada por la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (PRONABIVE), SARH, y por los laboratorios SANFER-SANYCONN.

La "cepa" PAV-1 fue obtenida inicialmente, en la Universidad de Cornell, Ithaca, Nueva York, EUA, a partir de la "cepa" A del virus FPC (8, 9, 25, 28). Esta "cepa" PAV-1 fue propagada por pases seriados en cultivos celulares (25, 28, 36, 37). Inicialmente mataba a los cerdos, pero posteriormente, después de ser pasada 40 veces en la línea de células PK-15, ya no fue letal para los cerdos, aunque todavía se diseminaba de los vacunados a los susceptibles puestos en contacto (37). Después, al pase 70, ya no podía ser transmitida de los cerdos vacunados a los cerdos susceptibles puestos en contacto, siempre y cuando estos cerdos procedieran de madres inmunes. Pero en ese momento todavía se podía transmitir si se utilizaban cerdos procedentes de madres susceptibles (25, 28).

A los 75 pases fue usada en los EUA en millones de cerdos, como una vacuna contra la FPC, que se aplicaba simultáneamente con suero hiperinmune contra la FPC. Posteriormente se utilizó en los EUA, en su pase 125, aplicada sin suero hiperinmune (25).

Se observó que este virus, a los 125 pases, todavía se difundía si los cerdos usados en la prueba de contacto procedían de madres no inmunes; ya que había difusión cuando se ponían en contacto cerdos susceptibles vacunados, con cerdos completamente susceptibles (25).

Al pase 250, en pruebas preliminares, se observó que el virus no se difundía de los cerdos vacunados a los cerdos completamente susceptibles puestos en contacto (Baker et al, no publicado; 25, 28).

Cuando ya se había logrado darle 250 pases a la "Cepa" PAV-1, se obtuvo la "Cepa" PAV-250; sin embargo, para entonces en los EUA ya había sido prohibida la utilización de todas las vacunas contra la FPC (25, 28), ya que la Campaña de Erradicación de la FPC, en los EUA, se basó en el sacrificio de los animales afectados.

La "cepa" vacunal PAV-250 contra la FPC ha sido posteriormente estudiada en el Proyecto FPC del INIFAP, SARH, México (23, 25, 30). Y se ha encontrado que se trata de una vacuna antigénica, que produce índices de protección muy altos, no produce signos clínicos en los vacunados y dado que no se disemina de los cerdos vacunados a los susceptibles puestos en contacto, no hay peligro de que se difunda a las cerdas preñadas susceptibles (25), y por ello no hay posibilidad de que revierta a la virulencia; además de que pueden inmunizarse lechones de 1, 7, 14 y 21 días de edad (17, 29); mediante estudios recientes, se ha demostrado que esta vacuna puede ser utilizada para proteger cerdas, sin memoria inmunológica contra la FPC, que estén en celo, o a los 30, 60 y 90 días de la gestación, sin que se presenten efectos indeseables (5, 6, 7); y por eso puede usarse con toda confianza en una campaña de erradicación de la FPC, basada en la vacunación masiva, tanto de cerdos de granjas tecnificadas, como en animales de traspatio (16, 23, 25, 30). Las cualidades de esta vacuna la acercan a las de la vacuna ideal (24, 56).

La técnica de producción de la vacuna PAV-250 ha sido desarrollada y modificada poco a poco, con el objeto de mejorar el título viral de dicha vacuna³. Desde hace varios años se han estado produciendo lotes de la semilla de la vacuna PAV-250, en el Proyecto FPC del CENID-MICROBIOLOGIA, INIFAP, SARH, México. Esto se ha hecho cosechando a los 6 días después de la inoculación de las células PK-15, basándose en estudios anteriores, de carácter preliminar³. Sin embargo, tomando en cuenta que la técnica de producción ha sufrido continuas modificaciones, es necesario que se hagan estudios que señalen el momento de multiplicación inicial de este virus vacunal, y el momento en que hay mayor producción de virus, por parte de las células previamente inoculadas, dentro del mencionado período de 6 días; ni cual sería la dosis de antígeno más adecuada para inocular los monoestratos y obtener un mejor título viral en la vacuna. Por ello se hace necesario determinar la curva de crecimiento de este virus, bajo las actuales condiciones en que está siendo cultivado, con las modificaciones que se han hecho al través del tiempo, en las cuales ya se está utilizando la esterilización mediante irradiación con rayos Gamma a 25 Kilo Gray (KGy), del Suero Fetal de Ternera (SFT), utilizado para el enriquecimiento del medio de cultivo, además de la inactivación del suero en baño de María (30 minutos a 56°C), y del empleo de células PK-15 libres de contaminación por el virus de la DVB (31, 32).

OBJETIVOS

1) Determinar la curva de crecimiento de la "cepa" vacunal PAV-250, inoculando células PK-15 con dos diferentes dosis infectantes de este virus.

2) Determinar en qué período, en ambos tratamientos, el virus vacunal PAV-250 alcanza su máximo título, para así poder recomendar que esta vacuna contra la FPC sea cosechada en el período óptimo.

MATERIAL Y METODOS

I.- DETERMINACION DE LA CURVA DE CRECIMIENTO DEL VIRUS VACUNAL PAV-250, AL INOCULAR CELULAS PK-15 CON APROXIMADAMENTE 100 UNIDADES FORMADORAS DE FOCOS FLUORESCENTES (UFFF) 50%.

1.1. Multipliación inicial de las células PK-15.

En cinco botellas de Roux, estériles, se sembraron células de la línea PK-15 (riñón de cerdo) suspendidas en 80 ml de medio de crecimiento (Medio Mínimo Esencial) (MME); enriquecido con 10% de Suero Fetal Bovino⁴; conteniendo además 500 UI de penicilina, 0.1 mg de estreptomina y 20 UI de micostatin por ml de MME. Después se procedió a incubarlas durante 48 horas en una estufa de cultivo mantenida a 37°C.

1.2. Conteo de las células.

Con el fin de conocer el promedio aproximado de células existentes en uno de los monoestratos, previamente preparados en las botellas de Roux, y con base en esto calcular la cantidad de células, que a partir de esta monocapa iban a ser sembradas en las botellas de Dilución de Leche (DL)⁵, se realizó un conteo celular:

⁴ Fetal Bovine Serum, Qualified, GIBCO, Cat. No. 200-6140PJ (GIBCO BRL, Cat. No. 26140-038).

⁵ Botella para Dilución de Leche, Capacidad 160 ml. Thomas Scientific, Apparatus, 1980, Cat. No. 1756-H31 (Corning, Cat. No. 1367 y 1372)

1.2.1. Técnica de Cumming (1975).

Las células de una monocapa celular de dos días de edad, obtenida de una botella de Roux, después de haber sido tripsinizadas y centrifugadas en refrigeración a 1,000 rpm durante 10 minutos, fueron suspendidas en 20 ml de medio de crecimiento; se separó un ml y se le agregaron 0.2 ml de Colorante Azul Tripán⁶, previamente disuelto al 0.4% en solución salina. Se llenó la una cámara de Neubauer (20) con la muestra, y se contaron las células viables (no teñidas), de los cuatro cuadrados primarios de las esquinas. Se calculó el promedio por cuadrado y éste se multiplicó por 6/5, para considerar el título de dilución con el colorante. El resultado obtenido se multiplicó por el factor 10⁴, para así obtener el número de células por ml (34).

1.3. Producción de las monocapas en las botellas de DL y en los tubos de Leighton.

Los monoestratos de las cuatro botellas de Roux restantes también se tripsinizaron y se centrifugaron, en igual forma que el monoestrato utilizado para hacer el conteo celular inicial. Una vez obtenido el paquete celular de estas cuatro botellas, se mezcló con la suspensión celular de la primera botella, y todo se reconstituyó en 920 ml de medio de crecimiento; con esta suspensión se sembraron 40 botellas de DL, depositando 20 ml en cada una; y se depositaron 2 ml en cada uno de los 60 tubos de Leighton, los cuales contenían dentro una laminilla cubreobjetos. Estas botellas y tubos fueron incubados durante 48 horas, a 37°C, en una estufa de cultivo.

⁶ Trypan Blue Stain 0.4%, GIBCO. Cat. No. 630-5250.

Estos tubos de Leighton se utilizaron posteriormente para titular la "cepa" vacunal PAV-250, la cual fue diluida para inocular los monoestratos de las botellas de DL.

Todas las botellas de DL se revisaron a contraluz y en el microscopio estereoscópico a los dos días, para asegurarse de que el crecimiento celular fuera homogéneo, y con un 80-90% de crecimiento en el monoestrato. De las 40 botellas de DL sembradas se seleccionaron 23, que fueron con las que posteriormente se trabajó.

1.4. Titulación inicial del virus vacunal PAV-250, lote 1-86.

Una botella de Roux, sembrada 48 horas antes con células PK-15, se tripsinizó y centrifugó, y las células obtenidas se utilizaron para sembrar 60 tubos de Leighton que contenían en su interior una laminilla cubreobjetos, dejándolos en incubación a 37°C, durante 48 horas, en una estufa de cultivo.

Se reconstituyó con 10 ml de agua bidestilada estéril un frasco de la vacuna liofilizada PAV-250, lote 1-86 y se procedió a su titulación empleando los tubos de Leighton anteriormente mencionados. El método que se siguió para hacer la titulación fue por la Técnica Directa de AF (inciso 1.7) y el cálculo del título final fue hecho por el método de Reed y Muench (47) (inciso 1.8).

1.5. Inoculación de los monoestratos con el virus vacunal PAV-250.

1.5.1. Se reconstituyó con 10 ml de agua bidestilada estéril un frasco de la vacuna liofilizada PAV-250, lote 1-86, la cual había sido previamente titulada y que mostró un título de $10^{5.5}$ UFFF 50%/0.2 ml; y luego se realizó la dilución necesaria, utilizando MME sin suero, para tratar de ajustar el título a aproximadamente $10^{2.0}$ UFFF 50%/0.2 ml (100 UFFF 50%/0.2 ml). Con esta dilución se inocularon las monocapas de las botellas de DL.

1.5.2. Los monoestratos de las 23 botellas de DL seleccionadas, después de decantarles el medio de crecimiento y de lavarlos con una solución de PBS 1X estéril (a 37°C), se trabajaron de la siguiente manera:

1) Se utilizaron 2 botellas de DL, conteniendo monocapas de células PK-15, como controles de células no inoculadas, a las cuales se les adicionaron 20 ml de medio de mantenimiento (MME, enriquecido con 2% de Suero Fetal Bovino, 500 UI de penicilina, 0.1 mg de estreptomycinina y 20 UI de micostatin por ml de MME) y se pusieron en incubación a 37°C, en una estufa de cultivo, durante las 24 horas que correspondieron a la primera etapa de este experimento, tiempo durante el cual fueron observadas periódicamente.

2) A las 21 botellas restantes, después de haber lavado sus monoestratos con PBS 1X estéril, y después de haber desechado este PBS, se les adicionó a cada una 3 ml del virus vacunal PAV-250, previamente reconstituido y diluido de modo que la dosis inoculada contenía aproximadamente $10^{2.0}$ UFFF 50%/0.2 ml (aproximadamente 100 UFFF/0.2 ml),

y se incubaron a 37°C durante 60 minutos, moviéndolas cada 10 minutos, para lograr una adecuada distribución del inóculo. La suspensión viral sobrante fue envasada en viales y estos fueron rotulados, procediéndose a la titulación de uno de ellos, una vez que se terminaron de inocular las botellas de DL; los viales sobrantes fueron congelados a -70°C en un congelador REVCO.

3) Transcurrido el tiempo de incubación, a cada botella de DL con monoestrato de células PK-15, se le decantó el líquido inoculado y se sustituyó por 20 ml de medio de mantenimiento, dejándose en incubación a 37°C hasta el momento de ser congeladas. Lo cual se realizó congelándolas en hielo seco con alcohol (a -70°C aproximadamente), para evitar variaciones en el tiempo de congelación. La elección de las botellas en cuanto al orden en que fueron congeladas se hizo completamente al azar, rotulándose en ese momento con el número de horas que tenían de incubación, de acuerdo a la Tabla 1. Desde ese momento, todas las botellas se conservaron en un congelador REVCO a -70°C, hasta el momento de ser descongeladas para ser titulado su contenido viral.

1.5.3. Con el objeto de determinar la proporción existente entre el número utilizado de partículas virales infectantes y el número de células correspondientes, se determinó por separado, el número de células PK-15 existentes en tres monocapas de botellas de DL, realizando el conteo celular mediante la técnica de Cumming (Inciso 1.2.); obteniendo el promedio de células de las tres botellas.

TABLA 1.- TIEMPO DE INCUBACION TRANSCURRIDO DESDE EL MOMENTO DE LA INOCULACION DE LAS MONOCAPAS CON APROXIMADAMENTE 100 UFFF DE LA "CEPA" PAV-250, HASTA EL MOMENTO DE SU CONGELACION.

BOTELLA NO.	TIEMPO DE INCUBACION (HORAS)
1	1
2	2
3	3
4	4
5	5
6	6
7	7
8	8
9	9
10	10
11	11
12	12
13	13
14	14
15	15
16	16
17	17
18	18
19	19
20	20
21	24

1.6. Titulación de la "cepa" vacunal PAV-250, lote 1-86, contra la FPC, la cual fue previamente diluida para inocular las botellas de DL.

Utilizando los tubos de Leighton que contenían las monocapas de células PK-15, se procedió a hacer la comprobación del título de la dilución de la vacuna PAV-250, utilizada inicialmente para inocular los monoestratos de las botellas de DL.

Este procedimiento se realizó en refrigeración (sobre hielo picado), de la siguiente manera:

- Se hicieron diluciones logarítmicas desde 10^{-1} hasta 10^{-6} , utilizando para ello 6 tubos de ensayo, los cuales fueron rotulados para su identificación, y en cada uno inicialmente se depositaron 1.8 ml de MME, sin suero.

- Al primer tubo se le adicionaron 0.2 ml de la dilución empleada de la "cepa" PAV-250, quedando en este tubo la dilución 10^{-1} ; la cual se agitó para mezclar perfectamente y se tomaron de este tubo 0.2 ml, para depositarlos en el siguiente tubo, para obtener así la dilución 10^{-2} .

- Se realizó lo mismo, con las diluciones siguientes, hasta llegar a la dilución 10^{-6} .

- Antes de infectar cada monocapa de los tubos de Leighton, se desechó el medio de cultivo que contenían, y cada tubo fue inoculado con 0.2 ml de las diluciones realizadas. Con cada una de las diluciones se inocularon 5 de las

monocapas contenidas en los tubos de Leighton.

- Todos los tubos inoculados se incubaron por 60 minutos a 37°C, moviéndolos suavemente cada 10 minutos.

- También se utilizaron 2 tubos que contenían monoestratos no inoculados, que sirvieron como controles negativos; y se trabajaron también 2 tubos que sirvieron como controles positivos para la prueba de fluorescencia, tratados de igual manera, pero inoculados con 0.2 ml de la "Cepa A" de FPC.

- Después del tiempo de incubación de 60 minutos, a cada uno de los tubos se les adicionaron 2 ml de medio de mantenimiento.

- Se dejaron incubando todos los tubos de Leighton en la estufa de cultivo durante 5 días a 37°C.

1.7. Tinción de las laminillas, por la Técnica Directa de AF.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se extrajeron las laminillas de los tubos de Leighton, se dejaron escurrir y se fijaron en acetona, a temperatura de laboratorio, durante 10 minutos.

Para teñir los monoestratos celulares, se identificaron y se depositaron sobre cada laminilla aproximadamente 0.05 ml de conjugado para el diagnóstico de la FPC (26) producido por el Proyecto FPC del GENID-MICROBIOLOGIA del INIFAP, SARH, México. Después las laminillas se incubaron a 37°C en una cámara humidificada, durante 30 minutos. Pasado este tiempo, se desechó el conjugado de cada una de las laminillas, se enjuagó cada laminilla 10 veces con PBS 1X, y se dejaron nuevamente durante 10 minutos en un recipiente con PBS 1X; después se volvieron a lavar 10 veces, en agua destilada, dejándolas secar a temperatura de laboratorio. Por último, se pusieron en un portaobjetos una o dos gotas de glicerina con PBS 1X, a partes iguales, y se invirtieron las laminillas cubreobjetos, de modo que los monoestratos quedaran colocados hacia abajo, directamente sobre la superficie del portaobjetos previamente identificado (18).

1.8. Lectura de las laminillas e interpretación de los resultados.

La lectura de las laminillas se hizo observándolas en un microscopio de luz ultravioleta⁷. Primeramente se observaron los monoestratos controles negativos, para verificar que no hubiese fluorescencia; luego los controles positivos, en los que debería estar presente la fluorescencia específica; y por último, se observaron los

⁷ Microscopio de Luz Ultravioleta (UV), Inmunopan, American Optical, equipado con Lámpara de Halógeno, Objetivo Planacromático Flór 16/0, 50, 160/0, 17, oculares Reichert PK 8X, Filtro Barrera 0.3, Filtro Barrera Azul 3, 18X 30G 515, GG9, Filtro Excitador 30, 8X 1F1TC3 y Filtro Barrera Rojo 30.8X2.5, B638.

monoestratos previamente inoculados con cada una de las diluciones, buscando focos fluorescentes e interpretando como positiva a la laminilla perteneciente a la dilución en la cual se observó fluorescencia específica, correspondiente al antígeno del virus de la FPC.

El cálculo del título de la vacuna inicialmente utilizada y de cada una de las muestras cosechadas se hizo por el método de Reed y Muench (48).

Con los resultados obtenidos se hicieron pruebas de correlación lineal, empleando para el análisis estadístico, el paquete computacional Statistical Analysis System (SAS).

1.9. Titulación del virus vacunal PAV-250, lote 1-86, el cual fue inoculado en los monoestratos que fueron incubados durante diferentes períodos antes de ser congelados.

Después de congelar la última botella de DL inoculada con el virus vacunal, se procedió a realizar la titulación de cada una de las muestras congeladas. Se descongeló una de las botellas en el chorro de agua, a temperatura de laboratorio; el contenido de cada botella se agitó para que las células, que fueron congeladas y descongeladas, se fragmentaran y dejaran libre su contenido viral y luego el contenido se colectó y se centrifugó a 2000 rpm durante 30 minutos, a 4°C. Se separó el sobrenadante, se agitó y con él se hicieron inmediatamente alícuotas de 2 ml cada

una, que se congelaron de inmediato a -70°C en un congelador REVCO, almacenándose todas las muestras, menos una alícuota por botella, para realizar la titulación viral, del mismo modo en que se describió anteriormente para titular la vacuna PAV-250, inicialmente utilizada.

2.- DETERMINACION DE LA CURVA DE CRECIMIENTO DEL VIRUS VACUNAL PAV-250, AL INOCULAR CELULAS PK-15 CON APROXIMADAMENTE 1000 UFFF 50%.

2.1. Multipliación inicial de las células PK-15.

Se sembraron 3 botellas de Roux con células PK-15 suspendidas en medio para crecimiento, y se incubaron en una estufa de cultivo, a 37°C, durante 48 horas.

2.2. Conteo de las células.

Con el fin de conocer el promedio aproximado de células que serían sembradas en cada botella de DL, se realizó un conteo celular con los monoestratos de tres botellas de Roux previamente preparados. Para lo cual éstas se tripsinizaron y después se centrifugaron en refrigeración a 1000 rpm, durante 10 minutos, para así obtener el paquete de células. Y a partir de éste se tomó una muestra para realizar el conteo celular, siguiendo el método ya descrito en el inciso 1.2. Y con el resto se sembraron las botellas de DL; y también se aprovecharon para preparar las monocapas en los tubos de Leighton.

2.3. Producción de las monocapas en las botellas de DL y en los tubos de Leighton.

Con el paquete de células de las tres botellas de Roux, se sembraron 20 botellas de DL y 54 tubos de Leighton conteniendo una laminilla cubreobjetos en su interior; los cuales se incubaron a 37°C durante 48 horas, y se utilizaron para posteriormente infectar los monoestratos de las botellas de DL y para titular ese mismo virus vacunal en los tubos de Leighton.

Todas las botellas de DL se revisaron utilizando un microscopio estereoscópico a los dos días, para comprobar que hubiera un crecimiento homogéneo, y un 80-90% de confluencia celular en el monoestrato. De las 20 botellas de DL sembradas se seleccionaron 15, que fueron con las que posteriormente se trabajó.

2.4. Titulación inicial del virus vacunal PAV-250, lote 2-86.

Esta titulación se hizo, siguiendo el mismo procedimiento descrito en el inciso

1.4.

2.5. Inoculación de los monoestratos con el virus vacunal PAV-250.

Un frasco de la vacuna liofilizada PAV-250, lote 2-86 se reconstituyó con 10 ml de agua bidestilada estéril y se agitó. Esta vacuna había sido previamente titulada, mostrando un título de $10^{3.35}$ UFFF 50%/0.2 ml. Posteriormente, en un matraz, se agregaron 90 ml de agua bidestilada estéril fría y los 10 ml de la vacuna PAV-250 (con lo cual quedó diluida 1:10) para tratar de ajustar el título a aproximadamente 1000 UFFF/3 ml; se le mantuvo en refrigeración y en agitación constante para homogenizar la mezcla y mantenerla fría. Para entonces ya se contaba con 13 botellas de DL identificadas de acuerdo a la Tabla 2.

Inmediatamente después se procedió a desechar el medio de cultivo de cada una de las botellas de DL; y a cada botella se le agregaron de 3 a 5 ml de PBS 1X estéril (a 37°C), para con él lavar el monoestrato. Después de desechar el PBS, se procedió a depositar 3 ml de la vacuna PAV-250, ya diluida (conteniendo aproximadamente 1000 UFFF 50%/0.2 ml), dentro de cada una de las 13 botellas de DL ya identificadas. Estas botellas se incubaron durante una hora a 37°C, moviéndolas cada 10 minutos. Pasado este tiempo se les adicionó, a cada una de las botellas, 20 ml de medio de mantenimiento. Se dejaron 2 botellas control no inoculadas, a las cuales también se les cambió el medio de cultivo. Todas las botellas se incubaron nuevamente a 37°C, durante el tiempo señalado en la Tabla 2.

TABLA 2.- TIEMPO DE INCUBACION TRANSCURRIDO DESDE EL MOMENTO DE LA INOCULACION DE LAS MONOCAPAS CON APROXIMADAMENTE 1000 UFFF DE LA "CEPA" PAV-250, HASTA EL MOMENTO DE SU CONGELACION.

NUMERO DE BOTELLA	TIEMPO DE INCUBACION POSTINFECCION	
	HORAS	DIAS
1	1	0
2	2	0
3	4	0
4	7	0
5	10	0
6	13	0
7	17	0
8	21	0
9	25	1
10	49	2
11	73	3
12	97	4
13	121	5

Antes de ser congelada cada botella fue identificada con su número, el número de horas postinoculación, y el día en que fue congelada. Después, la botella se congeló en una mezcla de hielo seco y alcohol para realizar la congelación rápidamente; y finalmente se almacenó en un congelador REVCO a -70°C . Este mismo procedimiento se realizó con todas las botellas.

Después se descongelaron las botellas una por una y se centrifugó su contenido, para posteriormente envasarlo en viales y congelarlos a -70°C ; para su ulterior titulación por la Técnica Directa de AF (18, 26).

Por separado, se determinó el número de células PK-15 existentes en dos monocapas de botellas de DL, realizando el conteo celular mediante la técnica de Cumming (Inciso 1.2).

2.6. Titulación de la "cepa" vacunal PAV-250, lote 2-86, contra la FPC, la cual fue previamente diluida para inocular las botellas de DL.

Paralelamente a la inoculación de las monocapas de las botellas de DL, se procedió a titular, por la Técnica Directa de AF, a la vacuna PAV-250; la cual fué inicialmente diluida para inocular los monoestratos de las botellas de DL (Inciso 2.5). Para la titulación se siguió el mismo procedimiento antes descrito en el inciso 1.6.

2.7. Tinción de las laminillas, por la Técnica Directa de AF.

El procedimiento de tinción se realizó de igual manera que en el inciso 1.7.

2.8. Lectura de las laminillas e interpretación de los resultados.

Se realizó de la misma forma que en el inciso 1.8.

- 2.9. Titulación del virus vacunal PAV-250, lote 2-86, el cual fue inoculado en monoestratos que fueron incubados durante diferentes periodos antes de ser congelados.

La titulación de los monoestratos se realizó de igual manera que en el inciso 1.9., excepto que al hacer las alícuotas de cada botella de DL, todas se congelaron a -70°C en un congelador REVCO. Posteriormente se tomó una alícuota, se descongeló y se empleó para efectuar la titulación viral. Lo cual fue realizado del mismo modo descrito en el inciso 1.6.

RESULTADOS

1.- **CURVA DE CRECIMIENTO DEL VIRUS VACUNAL PAV-250, AL INOCULAR CELULAS PK-15 CON APROXIMADAMENTE 100 UFFF 50%.**

Conteo de las células de las monocapas preparadas en las botellas de Roux.

El resultado obtenido del conteo celular fue de 2,751,000 células/ml, y de 220,080,000 células en total (80 ml).

Conteo de las células de las monocapas preparadas en las botellas de DL.

Al hacer el conteo celular de las tres botellas de DL se obtuvo un promedio de 257,000 células/ml, y un total de 5,140,000 células (20 ml).

Titulación inicial de la semilla vacunal PAV-250, lote 1-86.

El título obtenido fue de $10^{5.5}$ UFFF 50%/0.2 ml.

Titulación de la dilución de la semilla PAV-250, lote 1-86, empleada para inocular las botellas de DL.

Al titular la vacuna PAV-250, previamente diluida para inocular las botellas de DL, la concentración viral obtenida fue de $10^{2.25}$ UFFF 50%/0.2 ml. Lo cual correspondió a 325 UFFF 50%/0.2 ml.

Titulación de las muestras obtenidas a partir de las botellas de DL, que fueron inoculadas con la semilla vacunal PAV-250, lote 1-86, incubadas y cosechadas a diferentes períodos.

El título viral obtenido de las muestras cosechadas a diferentes períodos después de la inoculación, fue el que se presenta en la Tabla 3.

TABLA 3.- TITULO VIRAL OBTENIDO A PARTIR DE LAS COSECHAS DE LAS BOTELLAS DE DL INOCULADAS CON 325 UFFF 50%/0.2 ml, E INCUBADAS DURANTE DIFERENTES PERIODOS.

NUMERO DE BOTELLA	TIEMPO DE INCUBACION (HORAS)	TITULO OBTENIDO (UFFF50%/ 0.2 ml)	TITULO POR DOSIS VACUNAL (UFFF50%/ 2 ml)
1	1	$10^{2.16}$	$10^{3.16}$
2	2	Negativo*	Negativo*
3	3	$10^{0.22}$	$10^{1.22}$
4	4	$10^{1.57}$	$10^{2.57}$
5	5	$10^{0.4}$	$10^{1.4}$
6	6	$10^{2.83}$	$10^{3.83}$
7	7	Negativo*	Negativo*
8	8	$10^{1.33}$	$10^{2.33}$
9	9	$10^{0.6}$	$10^{1.6}$
10	10	Negativo*	Negativo*
11	11	$10^{0.4}$	$10^{1.4}$
12	12	Negativo*	Negativo*
13	13	Negativo*	Negativo*
14	14	$10^{1.84}$	$10^{2.84}$
15	15	$10^{1.83}$	$10^{2.83}$
16	16	$10^{0.2}$	$10^{1.2}$
17	17	$10^{3.16}$	$10^{4.16}$
18	18	$10^{3.54}$	$10^{4.54}$
19	19	$10^{2.18}$	$10^{3.18}$
20	20	$10^{2.50}$	$10^{3.50}$
21	24	$10^{0.22}$	$10^{1.22}$

* En las muestras que hubo resultados negativos, para comprobar, la titulación se repitió dos veces.

2.- CURVA DE CRECIMIENTO DEL VIRUS VACUNAL PAV-250, AL INOCULAR CELULAS PK-15 CON APROXIMADAMENTE 1,000 UFFF 50%.

Conteo celular de las monocapas preparadas en las botellas de Roux.

El resultado obtenido del conteo celular fue de 2,006,000 células/ml, y de 160,480,000 células en total (80 ml).

Conteo celular de las monocapas preparadas en las botellas de DL.

Al hacer el conteo celular de las dos botellas de DL se obtuvo un promedio de 255,000 células/ml, y un total de 5,100,000 células (20 ml).

Titulación de la semilla PAV-250 lote 2-86 (1:10).

Al realizar la lectura en el microscopio de luz ultravioleta, se determinó que el primer frasco de vacuna estudiado tenía un título de $10^{3.35}$ UFFF 50%/0.2 ml.

Titulación de la dilución de la semilla PAV-250 lote 2-86 (1:10), empleada para inocular las botellas de DL.

Al titular la dilución de la vacuna PAV-250, lote 2-86 (que fue empleada para inocular las botellas de DL), para corroborar si se habían usado 1000 UFFF/0.2 ml, el resultado obtenido fue un título de $10^{3.156}$ UFFF 50%/0.2 ml, el cual corresponde a 2,406 UFFF/0.2 ml.

Titulación de las muestras obtenidas, a partir de las botellas de DL que fueron inoculadas con la semilla PAV-250 lote 2-86 (1:10), y después incubadas y cosechadas a diferentes periodos.

Al titular las alícuotas procedentes de cada una de las botellas de DL, previamente inoculadas con el virus vacunal diluido, PAV-250, lote 2-86, y que después de diferentes periodos de incubación, fueron congeladas, se obtuvieron los resultados que se presentan en la Tabla 4.

TABLA 4.- TITULO VIRAL OBTENIDO A PARTIR DE LAS COSECHAS DE LAS BOTELLAS DE DL, DESPUES DE SER INOCULADAS CON 2,408 UFFF/0.2 ml, E INCUBADAS DURANTE DIFERENTES PERIODOS.

NUMERO DE BOTELLA	TIEMPO DE INCUBACION (HORAS)	TITULO OBTENIDO (UFFF50%/ 0.2 ml)	TITULO POR DOSIS VACUNAL (UFFF50%/ 2 ml)
1	1	$10^{2.37}$	$10^{3.37}$
2	2	$10^{2.56}$	$10^{3.56}$
3	4	$10^{3.84}$	$10^{4.84}$
4	7	$10^{4.31}$	$10^{5.31}$
5	10	$10^{2.69}$	$10^{3.69}$
6	13	$10^{4.12}$	$10^{5.12}$
7	17	$10^{4.44}$	$10^{5.44}$
8	21	$10^{2.0}$	$10^{2.00}$
9	25	$10^{4.58}$	$10^{5.58}$
10	49	$10^{4.22}$	$10^{5.22}$
11	73	*	*
12	97	$10^{3.70}$	$10^{4.70}$
13	121	$10^{1.37}$	$10^{2.37}$

* No se trabajó la muestra de la botella No. 11, colectada a las 73 horas de incubación.

3.- ANALISIS ESTADISTICO.

Se realizó un análisis estadístico por medio de la técnica de correlación lineal simple (58) con el paquete computacional SAS, para determinar si existía relación entre las variables siguientes: título obtenido en cada una de las cosechas, y la hora, o sea el tiempo que tardó en cosecharse la "cepa" PAV-250. Considerando desde la hora 1 a la 24, el resultado obtenido para los datos de las titulaciones de las botellas de DL infectadas con 325 UFFF, fue $r= 0.30$; y para las botellas de DL infectadas con 2,406 UFFF, de la hora 1 a la 121, fue de $r= 0.02$. Por otra parte, al determinar la correlación únicamente de los datos correspondientes a las fases de crecimiento logarítmico viral, al inocular con 325 UFFF, de la hora 2 a la 6 $r= 0.77$; y de la hora 13 a la 18 $r= 0.73$; y al utilizar 2,406 UFFF, de la hora 1 a la 7 $r= 0.96$.

DISCUSION

Desde las primeras comunicaciones en las que se informó que se logró cultivar el virus de la FPC *in vitro* (Hecke, 1932; Boyton, 1946), se han estudiado diferentes métodos de propagación del virus, siempre con el propósito de lograr reproducirlo en altos títulos, para utilizarlo en la producción de vacunas (11); o para la producción de altos títulos de antígenos, lo cual es indispensable para estudiar las propiedades físicas, genéticas (moleculares), e inmunológicas del virus (14).

Se debe tomar en cuenta que existen otros procedimientos para lograr aumentar el título de un virus, al reproducirlo en cultivos celulares.

Uno de estos métodos consiste en interferir la producción de interferón, en los cultivos celulares inoculados, con lo cual se ha podido lograr un aumento de la replicación del virus Chicungunya, y mantener altos títulos virales por un mayor período (40); lo mismo se ha logrado con el virus del Sarampión, usando la actinomicina D (43). Se ha comunicado que la actinomicina D inhibe en forma específica la síntesis del ARN, dependiente del ADN (3); la cual a la dosis de 0.5 $\mu\text{g/ml}$ es tóxica para las células PK-15; y a esta misma dosis disminuye la producción del virus de la FPC en un 50%, a la séptima hora, y en un 90% a la onceava hora. Esto probablemente se debe a los efectos tóxicos secundarios del inhibidor mencionado, sobre la célula hospedadora (3). Mientras que utilizando 0.05 $\mu\text{g/ml}$ produce una ligera estimulación de la multiplicación del virus de la FPC entre las 5 y las 11 horas postinoculación (3).

La mitomicina C a la dosis de 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ también provoca una estimulación de la producción del virus de la FPC, de modo que el título infeccioso es 50% mayor que en los controles, a las 14 horas postinoculación; y es 90% mayor a las 30 horas (3). Mediante la utilización de la mitomicina C también se ha logrado el aumento de la replicación del virus del Sarampión (53).

Un buen procedimiento de subcultivo celular es determinante para lograr incrementos de las poblaciones de células. La optimización de las condiciones de cultivo y de la actividad específica de la enzima proteolítica, es importante no solo para obtener el máximo desprendimiento celular, sino también para incrementar la viabilidad celular resultante y la eficiencia durante la readhesión. Todos estos factores son fundamentales, tal como ha sido señalado por Lindner *et al* (14).

El virus de FPC puede ser producido utilizando cultivos de monocapas de células PK-15 en botellas de Roux. Sin embargo, se obtienen títulos bajos, además de que utilizan considerables cantidades de medio de crecimiento y de tiempo; lo cual hace que éste método sea poco satisfactorio. Al intentar obtener cosechas de virus vacunal con altos títulos virales, además de tratar de encontrar el momento óptimo para la cosecha, también se debe investigar el efecto favorable que pueda tener la utilización de otros procedimientos, tales como la utilización de monocapas preparadas en cultivos rotatorios ("roller") (49), el empleo de microacarreadores (14), etc.

Pejsak *et al* (1991), mencionan que al utilizar un sistema de crecimiento celular estacionario en el que se emplearon botellas de Legroux inoculadas con el virus vacunal atenuado de FPC Cellpest, a una dosis de 10^5 TCID₅₀, lograron obtener cosechas con títulos altos (10^8 TCID₅₀); para lo cual infectaron células recientemente tripsinizadas, y las incubaron a 37°C durante 96 horas. Mientras que al infectar monocapas de células PK-15A preparadas en botellas "roller", con la misma dosis, obtuvieron títulos más altos ($10^{6.75}$ TCID₅₀). El título de este virus vacunal fue determinado por la prueba de inmunoperoxidasa (49).

Se ha logrado aumentar considerablemente la producción del virus de la FPC al inocular cultivos de células PK-15, conteniendo microacarreadores, mientras que fue menor el crecimiento obtenido con monocapas preparadas en botellas de Roux (14). Se ha observado que al utilizar microacarreadores, para células PK-15 en suspensión, se puede obtener un rendimiento del virus de FPC hasta 10 veces mayor, al comparar esto con los cultivos tradicionales en botellas de Roux. Lo cual se logra principalmente porque los microacarreadores permiten cultivar en un solo sistema grandes cantidades de células y por lo tanto de virus (14). Las técnicas de cultivo celular con microacarreadores permiten poder cultivar en un solo sistema grandes cantidades de células y de virus, con títulos hasta de $10^{9.2}$ DICC₅₀/ml. Por lo tanto esta técnica es considerada como un mejor método para producir virus de FPC (14). Y es muy probable que se obtengan buenos resultados al utilizar botellas NUNC de 3 pisos⁶.

⁶ Botella Triple Flask, Nunclon, Capacidad 800 ml. Thomas Scientific, 1994-1995, Cat. No. 9381-M83 y 9381-M86.

Comparando el título de virus de FPC que fue producido en botellas de Roux, con el título obtenido mediante la utilización de microacarreadores, en éste último sistema hubo un aumento de más de 1.5 logaritmos. Estos resultados concuerdan con los informados por Baljot *et al* (1987), (Citado por Calj *et al*, 1989) (14), quienes duplicaron el rendimiento del virus de la Enfermedad de Aujeszky, al producir un antígeno para la prueba de ELISA; y de Lazar *et al* (1987), (Citado por Calj *et al*, 1989) (14), quienes también encontraron altos rendimientos del virus Sindbis utilizando microacarreadores. Sin embargo, en ocasiones se han comunicado resultados menos exitosos al utilizar microacarreadores, ya que Rivera *et al* (1986), (Citado por Calj *et al*, 1989) (14), lograron títulos mayores de Parvovirus, en botellas de roller, que en cultivos con microacarreadores; y Whiteside y Spier (1981), (Citado por Calj *et al*, 1989) (14), produjeron virus de la Fiebre Aftosa utilizando microacarreadores, obteniendo títulos comparables a los logrados con botellas de Roux (14).

Uno de los objetivos de esta tesis fue determinar el momento óptimo de cosecha del virus de FPC, al cultivarlo mediante el sistema de monocapas de células PK-1, preparadas en botellas de DL. Tomando en cuenta que al cosechar el virus lo más pronto posible, dentro de estas condiciones, se puede ahorrar tiempo. Sin embargo, para reducir los costos de producción, además de lo anterior, se deben tomar en cuenta otros detalles, ya que hay trabajos que señalan que el sistema utilizado de cultivos celulares, puede influir en el título viral obtenido. Hayashi *et al* (1960), informan haber obtenido títulos de virus de FPC de aproximadamente 10^5 en cultivos de tejidos en suspensión, obtenidos de bazos de cerdos adultos; de 10^6 en

fragmentos de tejidos fijos; de 10^{-7} en cultivos rotatorios; y de 10^8 en cultivos rotatorios a los que se les cambió frecuentemente el medio de cultivo. Este último sistema fue el que dió mejor título viral, ya que fue comparable al obtenido en los tejidos procedentes de bazos colectados de cerdos infectados experimentalmente (39).

En la primera etapa experimental de esta tesis, el título viral de la dilución empleada para inocular las botellas de DL fue de $10^{2.25}$ UFFF 50%, lo cual significa que se utilizaron 325 UFFF 50%/0.2 ml, en lugar de las 100 UFFF 50%/0.2 ml que se habían pretendido inocular; mientras que en la segunda parte del experimento se inoculó con una suspensión viral que tenía un título de $10^{3.156}$ UFFF 50%, el cual corresponde a 2,406 UFFF 50%/0.2 ml, en lugar de las 1,000 UFFF 50% que se había planeado utilizar. Por lo que se puede considerar que el cálculo inicialmente hecho dió resultados muy cercanos a los esperados.

Al producir las monocapas de células PK-15 en las botellas de DL, en una superficie aproximada de 46 cm², se determinó que en cada monoestrato había, en promedio, un total de 5,120,000 células. Cuando dichas células fueron infectadas con 325 UFFF 50% la dosis de inoculación correspondió a 1 UFFF por cada 15,754 células; y en el experimento en el que se usaron 2,406 UFFF 50%, la dosis de inoculación correspondió a 1 UFFF por cada 2,128 células.

Aynaud en 1968 propagó una clona del virus de FPC, y al determinar su curva de crecimiento en células PK-15, cultivadas en suspensión, detectó la

presencia de la nueva progenie viral, a partir de las 5 horas postinoculación, en la mezcla colectada de células y medio de cultivo. Y hubo un crecimiento exponencial del título viral durante las siguientes 9 horas (3). De acuerdo con Aynaud (3), el ciclo de multiplicación del virus de la FPC tiene una duración de 15 horas.

Mengeling y Drake (1969), al estudiar la replicación de la "cepa" de exposición Ames, en células PK-15, encontraron que el antígeno viral fue inicialmente detectado intracitoplásmicamente a las 4 horas postinoculación, y la progenie viral a las 6 horas; y el título viral aumentó entre las 6 y las 24 horas postinoculación. Al adaptar este virus mediante 27 pases en cultivos celulares; disminuyó a 5 horas la aparición de la progenie viral (período de latencia); en las cosechas obtenidas, se lograron títulos más altos; y por otra parte, el período de latencia fue más corto al utilizar células PK-15 (6 horas), que en los cultivos primarios de riñón de cerdo (7 horas) (44).

Por otra parte, en esta investigación, como se puede apreciar en la Gráfica 1, una hora después de inocular con 325 UFFF se detectó un título de $10^{2.13}$ UFFF 50%/0.2 ml, el cual bajó a partir del momento de la inoculación, ya que no se detectó título viral a las 2 horas (fase de eclipse, que es cuando ocurre la síntesis de las diversas partes del virus (3)); a las 3 horas se detectó un título mínimo de $10^{0.22}$ UFFF 50%/0.2 ml, que se incrementó a las 4 horas hasta $10^{1.57}$ UFFF 50%/0.2 ml y que a las 6 horas fue de $10^{2.63}$ UFFF 50%/0.2 ml (fase de crecimiento exponencial, caracterizada por un aumento rápido del título infeccioso a causa de la liberación de nuevos viriones formados (3)); posteriormente el título viral descendió paulatinamente hasta las 12 y 13 horas, en que de nuevo no se detectó ningún título viral; lo cual

muy probablemente correspondió a la fase de eclipse del segundo ciclo de crecimiento viral. Este segundo ciclo de crecimiento aparentemente se inició a las 11 horas con $10^{0.40}$ UFFF 50%/0.2 ml, con un máximo título viral a las 18 horas de $10^{2.54}$ UFFF 50%/0.2 ml; el cual disminuyó progresivamente hasta las 20 horas a $10^{2.60}$ UFFF 50%/0.2 ml. Desafortunadamente no se programó muestrear entre las 21 y 23 horas; por ello no se puede saber la duración exacta de este segundo ciclo.

En sus experimentos, Aynaud utilizó una "clona" del virus de la FPC no adaptada a cultivos celulares, mientras que en esta tesis la "cepa" viral empleada ya tiene una adaptación de 250 pases en células PK-15. Esta puede ser la razón por la cual la aparición del virus PAV-250, se inició a partir de las 3 horas, mientras que en los trabajos de Aynaud, el virus de la FPC fue detectado a partir de las 5 horas (3). La dosis utilizada por Aynaud correspondió a una multiplicidad de infección de 30 UFFF por célula; mientras que en este trabajo para lograr infectar las células fue suficiente una multiplicidad de infección de 1 UFFF por cada 15,815 células al inocular con 325 UFFF 50%; no obstante que en las cosechas se obtuvieron títulos más bajos que los de Aynaud (3). El hecho de no haber detectado el antígeno viral en las cosechas correspondientes a las 7 y 10 horas, a pesar de haber repetido 2 veces las titulaciones, y el haber obtenido títulos virales sumamente bajos en las cosechas de las 3, 5, 9, 11, 16 y 24 horas, muy probablemente se debe precisamente a que la dosis inoculada fue muy baja, por lo cual no se logró infectar homogéneamente a las células de las diferentes monocapas. Es decir, que la dosis inoculada (325 UFFF 50%/0.2 ml) estuvo muy cerca de la dosis infectante 50%, tomando en cuenta el número de células existentes en cada monocapa; ya que la

multiplicidad de infección fue de aproximadamente 0.000063 UFFF por célula; mientras que Aynaud utilizó 30 UFPF por célula, además de que utilizó cultivos en suspensión, lo que le permitió una mayor superficie celular para la adsorción viral. En esta tesis, de la hora 14 hasta la 18 se observó la fase de crecimiento exponencial con la mayor multiplicación viral ($10^{3.54}$), y en adelante, la producción de virus descendió (Gráfica 1).

Con respecto a la segunda etapa de este trabajo (Gráfica 2), al inocular con 2,406 UFFF 50%, empleando una multiplicidad de infección de aproximadamente 0.00047 UFFF por célula, en el primer ciclo de replicación se observaron menos marcadas las diferentes etapas de las curvas de crecimiento, con títulos máximos entre las 4 y las 7 horas de $10^{3.84}$ y $10^{4.31}$ UFFF 50%/0.2 ml, respectivamente. Este descendió a las 10 horas hasta $10^{2.89}$ UFFF 50%/0.2 ml; lo cual correspondió al final del primer ciclo de crecimiento viral. El inicio del segundo ciclo viral ocurrió probablemente entre las 11 y 12 horas, presentó un máximo título viral a las 17 horas (de $10^{4.44}$ UFFF 50%/0.2 ml), y descendió a las 21 horas a $10^{2.0}$ UFFF 50%/0.2 ml, en que tal vez finalizó este segundo ciclo. Los títulos máximos se observaron a las 7 ($10^{4.31}$), 13 ($10^{4.13}$), 17 ($10^{4.44}$), 25 ($10^{4.56}$) y 49 horas ($10^{4.22}$); y se observaron títulos virales bajos a las 1 ($10^{2.37}$), 2 ($10^{2.56}$), 10 ($10^{2.69}$), 21 ($10^{2.0}$) y 121 horas ($10^{1.37}$). El período de latencia fue de aproximadamente 1 a 2 horas, observándose dicho período sólo cuando se inocularon los cultivos celulares con 325 UFFF 50%/0.2 ml, es decir, con dosis bajas de virus.

En los estudios realizados por Dunne y Luedke (1959), en los cuales inocularon cerdos susceptibles con virus virulento de FPC, por vía intravenosa, se observó que el virus estuvo presente en el torrente sanguíneo a los 15 minutos postinfección, pero no a los 30 minutos. Fue detectado de nuevo a las 12 horas cuando los cerdos habían sido inoculados con dosis menores de 10^6 ; y cuando la dosis letal inoculada fue de 10^6 , el virus fue detectado desde las 5 horas postinoculación, y en este caso no hubo un período en el cual el virus estuviera completamente ausente del torrente sanguíneo (35). Por otra parte, en nuestros experimentos, al inocular los cultivos celulares con 325 UFFF 50%/0.2 ml se detectó virus durante la primera hora de incubación de los monoestratos infectados, pero a la segunda hora no, o sea que el período de latencia fue de aproximadamente 1 hora; mientras que al inocular con 2,406 UFFF 50%/0.2 ml el virus se detectó continuamente desde la primera hora de incubación, hasta las 121 horas, sin observarse una fase de eclipse. O sea que hubo similitud entre las investigaciones realizadas en esta tesis y los estudios de Dunne y Luedke (1959), ya que cuando se inocularon los monoestratos celulares con una dosis baja, se pudo detectar la fase de eclipse; mientras que al inocular una mayor cantidad de virus (aproximadamente hubo un logaritmo de diferencia entre una y otra), la fase de eclipse no se observó (Gráficas 1 y 2).

Como ya se mencionó, se sabe que la cepa vacunal PAV-250 produce efecto citopático cuando se inocula muy concentrada; pero cuando se inocula muy diluida, entonces ya no se produce el ECP³; por ello, al inocular las células PK-15 con 325 UFFF, la síntesis del virus de FPC se efectuó de manera continua en las células

Infectadas, y estas células no únicamente no fueron destruidas, sino que además ellas pudieron continuar multiplicándose, dentro de las condiciones adecuadas de temperatura, alimentación, etc. (3). Gracias a lo anterior es que se pudieron llegar a detectar las primeras 2 curvas de crecimiento viral (Gráfica 1). E incluso Aynaud (3) afirma que a partir de las 15 horas, la síntesis del virus se efectúa de manera continua; y que se puede llegar a presentar un equilibrio entre la síntesis viral y la producción de nuevas células; las cuales estarán también infectadas y producirán virus con altos títulos, continuamente, durante muchos días.

Se ha comunicado (3) que si se utilizan temperaturas superiores a los 37°C, para multiplicar el virus de campo de la FPC, en células PK-15, la temperatura elevada (39°C) puede interferir con la multiplicación celular, y por lo tanto en forma parcial o total con la velocidad de multiplicación viral, e incluso puede inactivar en mayor o menor grado el virus producido, que ya se encuentra extracelularmente; lo cual podría ser especialmente notorio después de las 15 horas. Por otra parte, a 37°C las células infectadas se multiplicarán normalmente y el título infeccioso aumentará durante la fase de crecimiento exponencial, e incluso podría continuar con un ligero aumento progresivo después de la mencionada etapa (3). Y aunque Aynaud (3) menciona que la temperatura óptima para el desarrollo de la clona patógena de FPC que él estudió fue de 39°C, después de 15 horas la producción continua de este virus fue favorecida por las temperaturas "infra-óptimas" de 37 y 38°C, y pareció ser inhibida por las temperaturas "supra-óptimas" (40°C) (3). La "cepa" vacunal PAV-250, ha sido adaptada a las células PK-15, a 37°C, durante 250 pases, por lo cual ésta es la temperatura que se recomienda para su multiplicación (25).

En un estudio anteriormente realizado con la vacuna PAV-250, en el cual la semilla tenía un título inicial de $10^{5.0}/0.2$ ml, se observó que al inocular esta semilla sin diluir (Lote 1), en monocapas de células PK-15, se obtuvo una cosecha que tenía un título de $10^{5.0}/0.2$ ml (100,000 UFFF/0.2 ml); al inocular las células con la misma semilla, pero diluida 1:10 (10,000 UFFF/0.2 ml) (Lote 2), se obtuvo de nuevo una cosecha que tenía un título de $10^{5.0}/0.2$ ml; y al inocularlas con la semilla diluida 1:100 (1,000 UFFF/0.2 ml) (Lote 3), la cosecha obtenida tuvo un título de $10^{4.0}/0.2$ ml. Cinco años después de haber flofilizado estos 3 lotes, el primero tenía un título de $10^{2.37}/0.2$ ml; el segundo de $10^{3.35}/0.2$ ml; y el tercero de $10^{1.68}/0.2$ ml. Por lo que se concluyó que los 2 primeros lotes, especialmente el Lote 2, mostraron una adecuada estabilidad y título viral, al ser almacenados a 4°C , durante 5 años; mientras que no sucedió lo mismo con el Lote 3. De modo que en el segundo procedimiento descrito anteriormente, se gastó 10 veces menos semilla que con el primer procedimiento y se obtuvieron los mismos resultados, o un poco mejores, en cuanto al título y vida de anaquel de la cosecha; por lo cual fue el más recomendable (27).

En esta tesis, al utilizar el inóculo que contenía 2,406 UFFF 50%/0.2 ml, se obtuvieron como resultado títulos de multiplicación viral mayores y más estables que cuando se utilizó el inóculo con una dosis viral menor (325 UFFF 50%/0.2 ml) (Gráfica 3); lo cual coincide con el párrafo anterior, en el cual, al inocular con dosis menores se obtuvieron resultados menos aceptables.

Para determinar si existe una proporción entre el número de UFFF utilizadas y el número de células inoculadas en los experimentos mencionados en los dos

párrafos anteriores, se tiene que tomar en cuenta la cantidad de UFFF utilizadas y el número de células PK-15 que fueron inoculadas en cada caso. Como en el primer experimento del trabajo antes referido (27), se utilizaron botellas de Roux, se puede considerar que en cada monocapa había aproximadamente 190,300,000 células en total. Por lo tanto, en el Lote 1 hubo una proporción de 1 UFFF por cada 1,903 células; en el Lote 2 se utilizó 1 UFFF por cada 19,030 células; y en el Lote 3, 1 UFFF por cada 190,300 células. En esta tesis, al inocular con 2,406 UFFF y usando botellas de DL, hubo una proporción de 1 UFFF por cada 2,128 células; mientras que al inocular con 325 UFFF, hubo una proporción de 1 UFFF por cada 15,754 células. De lo cual se deduce que hubo similitud en la forma en que fueron preparados el Lote 1 (27) y las células inoculadas con 2,406 UFFF, de esta tesis.

Con base en esta comparación, es probable que se pudiera tener éxito si se inoculan botellas de Roux con aproximadamente 10,000 UFFF 50%/0.2 ml, y con una proporción de 1 UFFF por cada 19,030 células; o en el caso de las botellas de DL, se podrían inocular con aproximadamente 2,406 UFFF 50%/0.2 ml, y con una proporción de 1 UFFF por cada 2,128 células PK-15. En las Gráficas 4 y 5 se puede apreciar que tanto al inocular con 325 como con 2,406 UFFF, hay una tendencia ascendente del título viral durante las primeras 24-25 horas. Y que al inocular con 2,406 UFFF, cuando se evalúan los títulos virales desde las 25 hasta las 121 horas, entonces la tendencia ya es descendente (Gráfica 6). Lo cual indica que si se repitieran estos experimentos, la cosecha muy probablemente debería hacerse entre las 24-48 horas (Gráficas 7 y 8), antes de que disminuyan los títulos virales contenidos en las botellas inoculadas (Gráfica 2). Ya que en la Gráfica 7 se puede

observar que la línea de tendencia sigue siendo ascendente al considerar los datos obtenidos de la hora 1 hasta la 49. En la Gráfica 8 se hace una comparación de la tendencia del título viral de la hora 1 a la 25, de la 1 a la 49, de la 1 a la 97 y de la 1 a las 121 horas, al inocular con 2,406 UFFF, siendo posible ver que la tendencia es ascendente hasta cuando se incluye el resultado obtenido en la hora 97, pero ligeramente menor que la observada en la hora 49, y que cuando se incluye el resultado de la hora 121 la tendencia ya no es ascendente. Sin embargo, la recomendación anterior tendría que ser validada, dentro de las condiciones de producción de esta vacuna en cada laboratorio productor. Ya que si se utiliza un procedimiento diferente, en alguno de los aspectos, o diferentes reactivos, suero, medio de cultivo, células, dosis de inoculación, cantidad de medio de cultivo, etc., los resultados podrían variar.

En relación al análisis estadístico, cuando se determinó en ambos experimentos el coeficiente de correlación (r) de todas las horas muestreadas, no se presentó una correlación estadísticamente significativa entre las variables siguientes: título obtenido en cada cosecha y tiempo que duró incubándose el virus vacunal en estudio antes de ser cosechado. Y esto fue debido a que los datos están muy dispersos, si se toma en cuenta para el análisis todo el período que duró cada uno de los 2 experimentos; es decir, porque hubo títulos muy bajos a lo largo de cada ensayo, y además porque éstos estuvieron integrados por varios ciclos de crecimiento viral. En el caso en que se utilizaron 325 UFFF la $r = 0.30$; y cuando se emplearon 2,406 UFFF la $r = 0.02$; estos datos de r están por debajo de 0.5, que es el nivel de confiabilidad que se está manejando, o sea, que aunque existe cierto grado de

correlación, éste es muy bajo, por lo que no se considera estadísticamente significativo. En cambio, al determinar el coeficiente de correlación y las tendencias, exclusivamente de los datos obtenidos durante las fases de crecimiento logarítmico, r fue estadísticamente significativo, y las tendencias fueron ascendentes. Al inocular con 325 UFFF, en la evaluación de la hora 2 a la 6 $r = 0.77$ (Gráfica 9), y de la hora 13 a la 18 $r = 0.73$ (Gráfica 10); y cuando se inoculó con 2,406 UFFF, al evaluar de la hora 1 a la 7 $r = 0.96$ (Gráfica 11).

En futuras investigaciones que se realicen para determinar la curva de multiplicación viral del virus de la FPC, es aconsejable recomendar que se siga el procedimiento descrito por Mengeling y Drake (44), en el cual se inoculó una monocapa de células PK-15, con la "cepa" Ames de FPC, y periódicamente se colectó una fracción del medio sobrenadante de la monocapa inocuada, para ser titulada, reponiendo dicho volumen con medio para cultivos celulares. Ya que el procedimiento seguido por Aynaud (3), así como el utilizado en esta tesis, como se puede observar en las Tablas 1 y 2 y en las Gráficas 1 y 2, tiene la desventaja de que, al utilizar una monocapa diferente para cada muestreo, desafortunadamente hay más probabilidades de obtener variaciones en los títulos, debidas a: monocapas diferentes, tamaño de la población celular, y por lo tanto, diferente proporción entre el número de partículas virales infectantes y el número de células; y otros factores, ya que se trata de diferentes monocapas y no de un solo monoestrato.

CONCLUSIONES

1.- El ciclo de crecimiento viral de la "cepa" vacunal PAV-250 dura aproximadamente 10 horas.

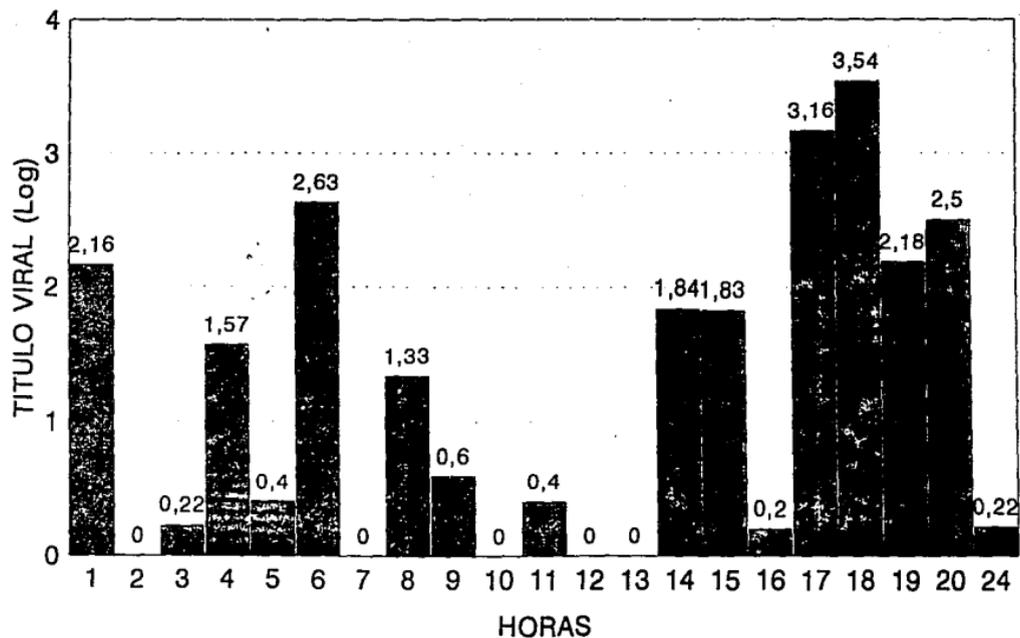
2.- Hubieron mejores títulos del virus vacunal PAV-250 y estos fueron más homogéneos al inocular las células PK-15 con 2,406 UFFF 50%, que al utilizar 325 UFFF 50%.

3.- Al inocular con 325 UFFF la fase de eclipse ocurrió a las 2 horas; la fase de crecimiento se presentó entre las 4 y 6 horas; y posteriormente los títulos descendieron paulatinamente hasta las 10 horas; y desaparecieron de nuevo a las 12-13 horas; y aparentemente éste último ya perteneció a la fase de eclipse de un segundo ciclo de crecimiento viral, en el que se presentaron títulos más elevados, entre las 14 y 20 o más horas. Al inocular con 2,406 UFFF, las diferentes etapas se notaron menos; sin embargo, se detectó un período de crecimiento hasta las 10 horas y otro hasta las 21 horas; y de las 25 a las 121 horas se notó una declinación del título viral.

4.- Con base en los datos obtenidos, para la producción de la semilla de la vacuna PAV-250 con altos títulos virales, es probable que se pudiera recomendar que se inoculen botellas de Roux con aproximadamente 10,000 UFFF 50%/0.2 ml, y con una proporción de 1 UFFF por cada 19,030 células. Y probablemente se podría

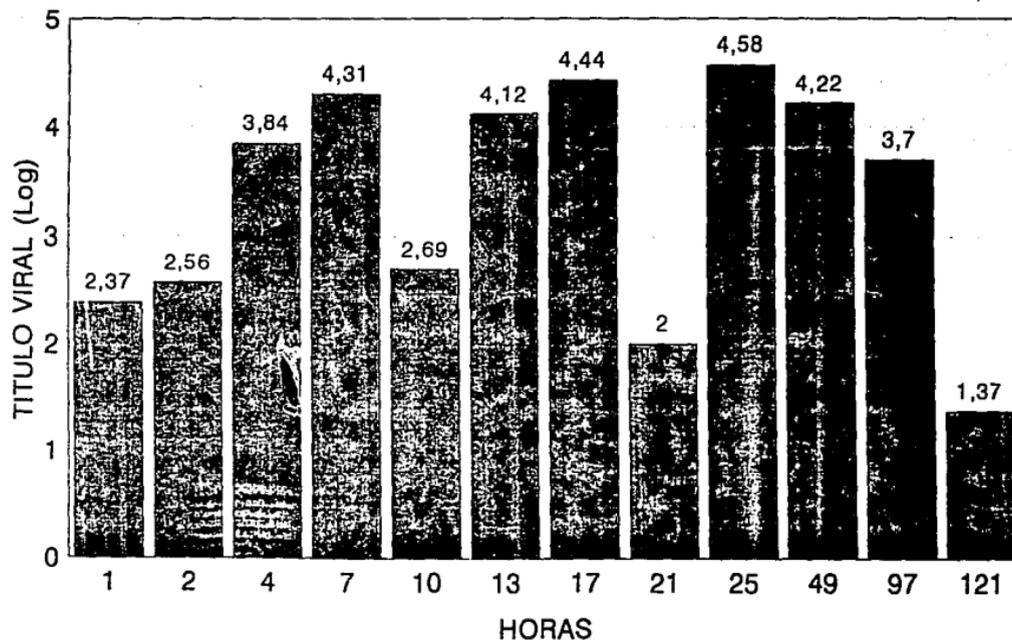
recomendar cosechar a partir de las 24-48 horas postinoculación. Para producir lotes con numerosas dosis de vacunas, se podrían hacer los cálculos necesarios, y utilizar botellas "roller", botellas Triple Flask, microacarreadores, etc. Sin embargo, las recomendaciones anteriores tendrían que ser validadas dentro de las diferentes condiciones de producción de esta vacuna, en cada laboratorio productor.

GRAFICA 1.- TITULO VIRAL DE LA VACUNA PAV-250 OBTENIDO A DIFERENTES HORAS A PARTIR DE BOTELLAS DE DL INOCULADAS CON 325 UFFF 50%/0.2 ml



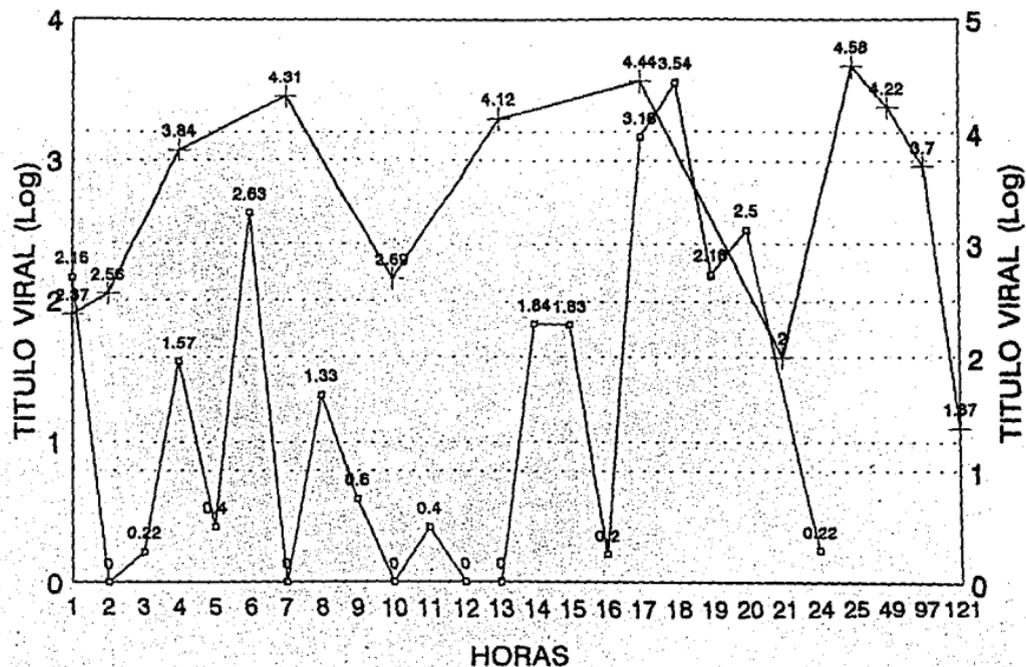
■ TITULO OBTENIDO

GRAFICA 2.- TITULO VIRAL DE LA VACUNA PAV-250 OBTENIDO A DIFERENTES HORAS A PARTIR DE BOTELLAS DE DL INOCULADAS CON 2,406 UFFF 50%/0.2 ml



■ TITULO OBTENIDO

GRAFICA 3.- TITULOS VIRALES DE LA VACUNA PAV-250 OBTENIDOS AL INOCULAR BOTELLAS DE DL CON 325 Y CON 2,406 UFFF 50%/0.2 ml

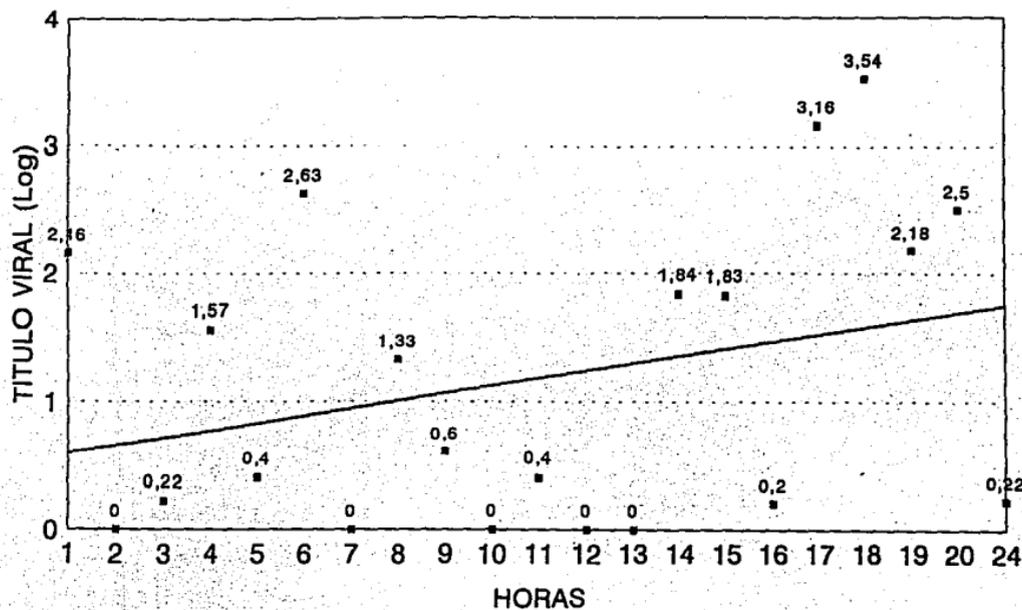


○ 325 UFFF/0.2 ml + 2,406 UFFF/0.2 ml

TESIS SIN PAGINACION

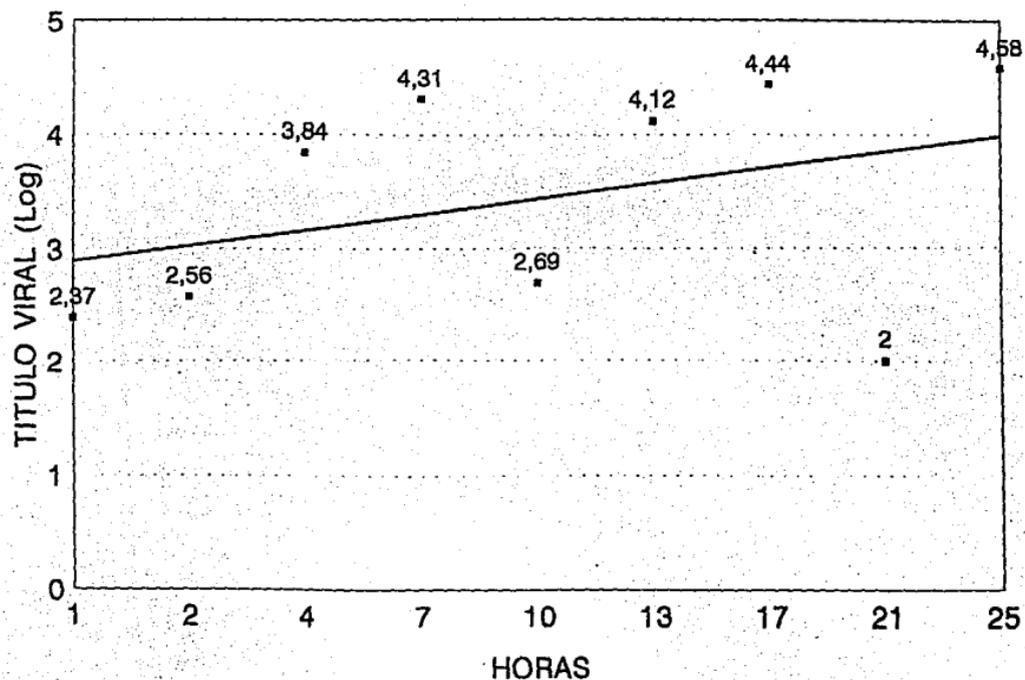
COMPLETA LA INFORMACION

GRAFICA 4.- TENDENCIA DEL TITULO VIRAL DE LA VACUNA PAV-250, DURANTE 24 HORAS, AL INOCULAR CON 325 UFFF 50%/0.2 ml



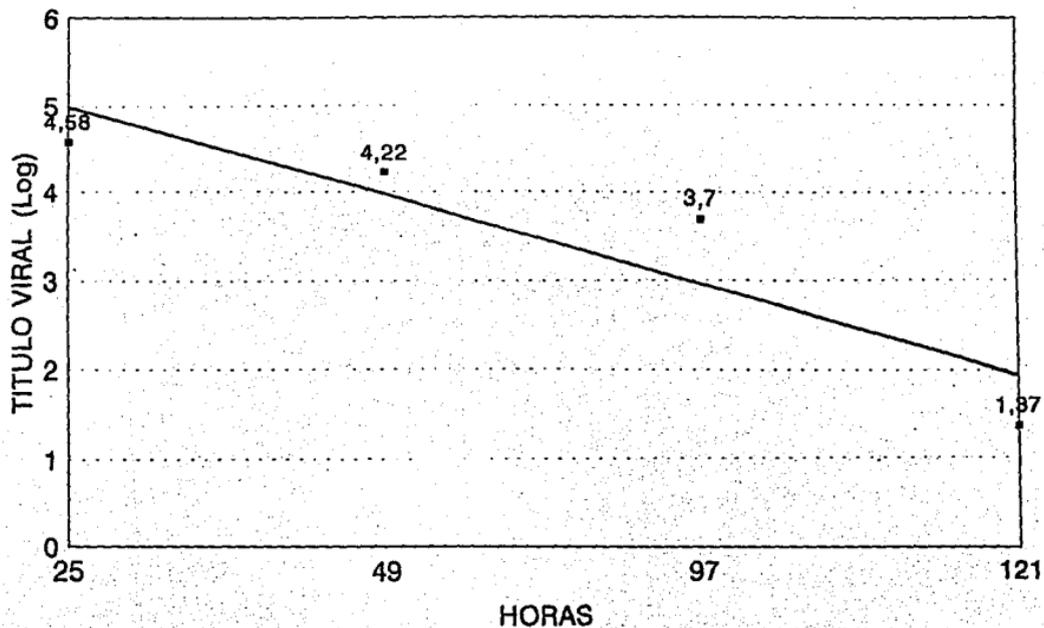
— TITULO OBTENIDO

GRAFICA 5.- TENDENCIA DEL TITULO VIRAL DE LA VACUNA PAV-250 DURANTE 25 HORAS, AL INOCULAR CON 2,406 UFFF 50%/0.2 ml



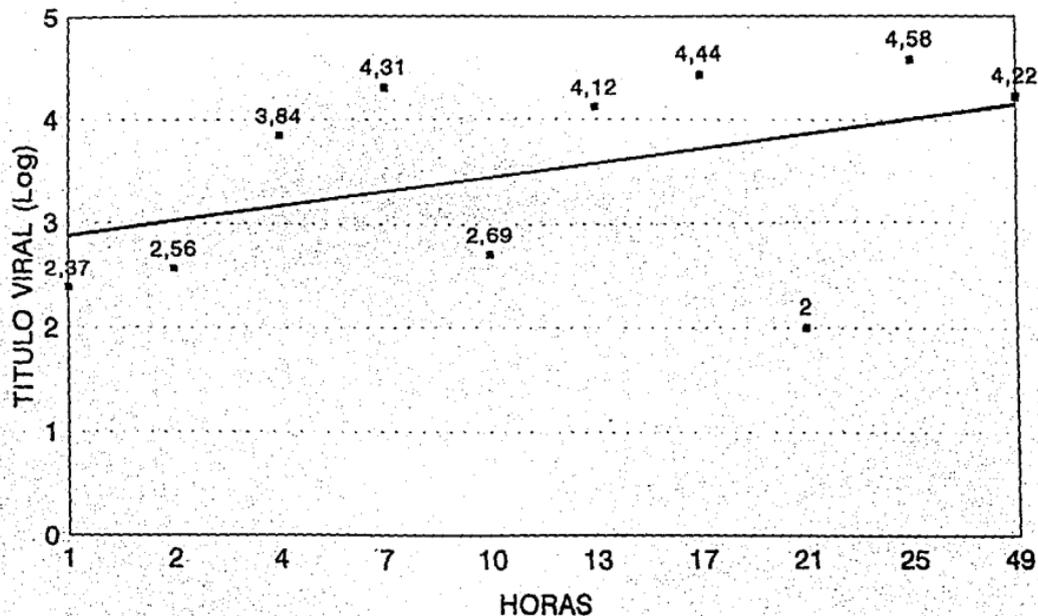
—•— TITULO OBTENIDO

GRAFICA 6.- TENDENCIA DEL TITULO VIRAL DE LA VACUNA PAV-250 DE LAS 25 A LAS 121 HORAS, AL INOCULAR CON 2,406 UFFF 50%/0.2 ml



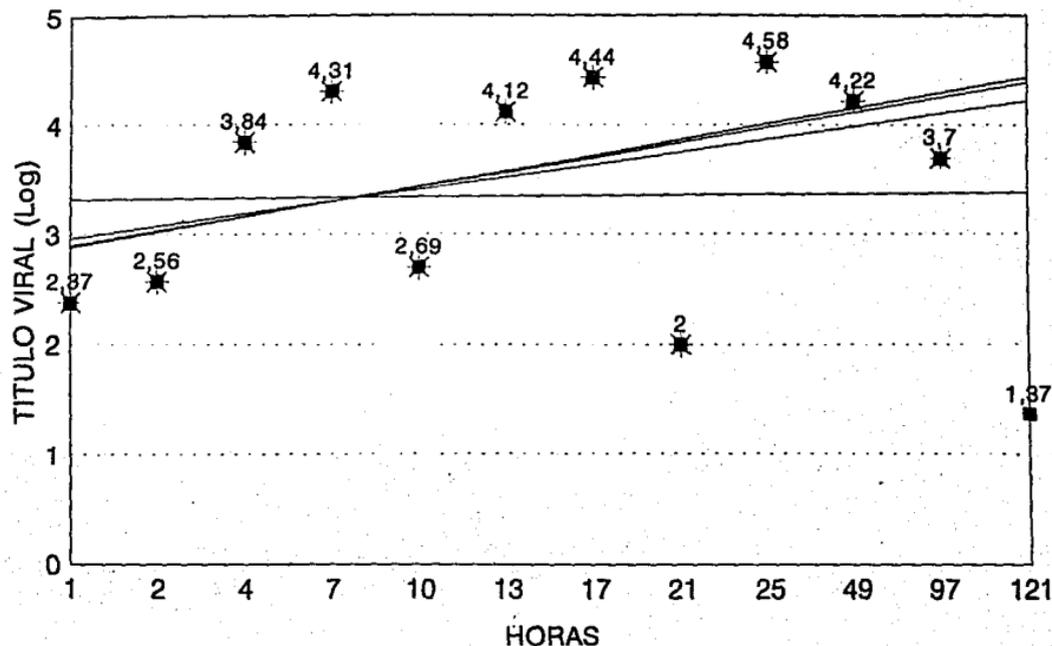
→ TITULO OBTENIDO

GRAFICA 7.- TENDENCIA DEL TITULO VIRAL DE LA VACUNA PAV-250 DE LA 1 A LAS 49 HORAS, AL INOCULAR CON 2,406 UFFF 50%/0.2 ml



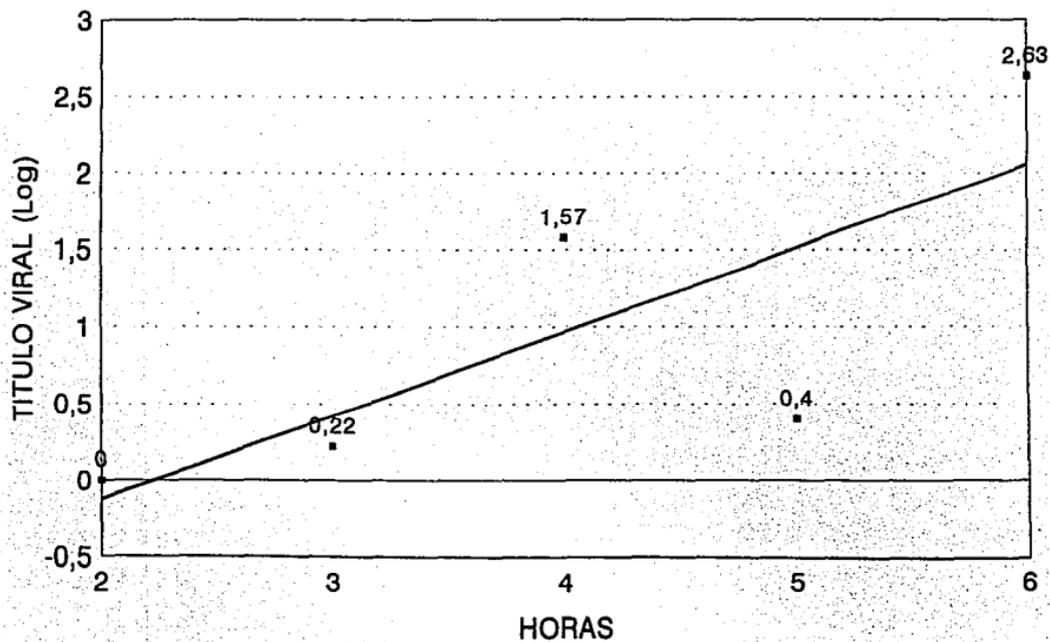
← TITULO OBTENIDO

GRAFICA 8.- COMPARACION DE LA TENDENCIA DEL TITULO VIRAL DE LA VACUNA PAV-250 A PARTIR DE LA HORA 1 A LAS 25, 49, 97 Y 121 HORAS, AL INOCULAR CON 2,406 UFFF 50%/0.2 ml



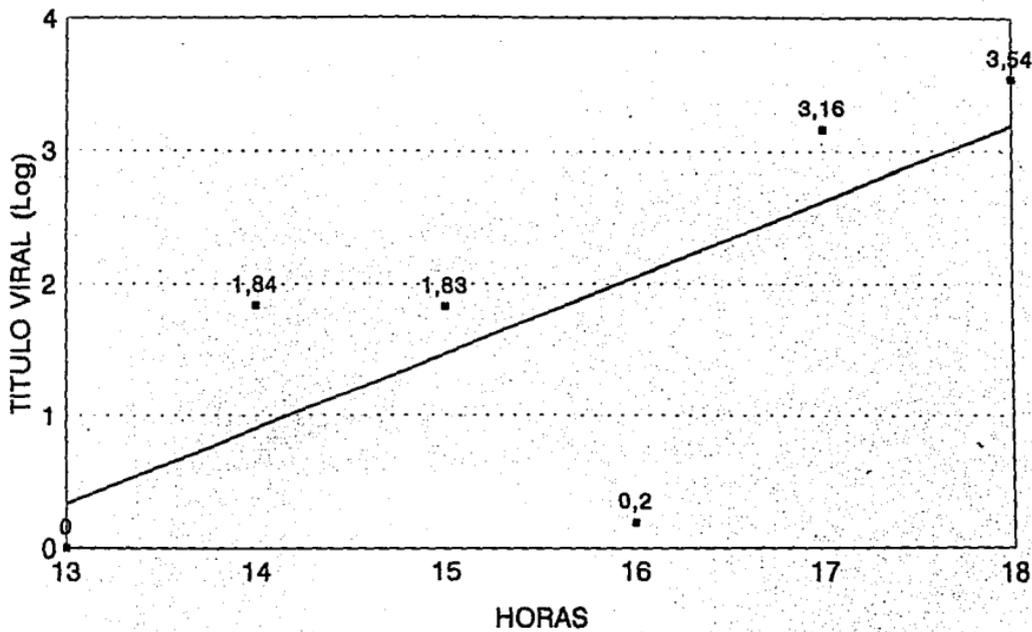
○ 1 A 25 HORAS + 1 A 49 HORAS * 1 A 97 HORAS ■ 1 A 121 HORAS

GRAFICA 9.- TENDENCIA DEL TITULO VIRAL DE LA VACUNA PAV-250 DE LAS 2 A LAS 6 HORAS, AL INOCULAR CON 325 UFF 50%/0.2 ml



—■— TITULO OBTENIDO

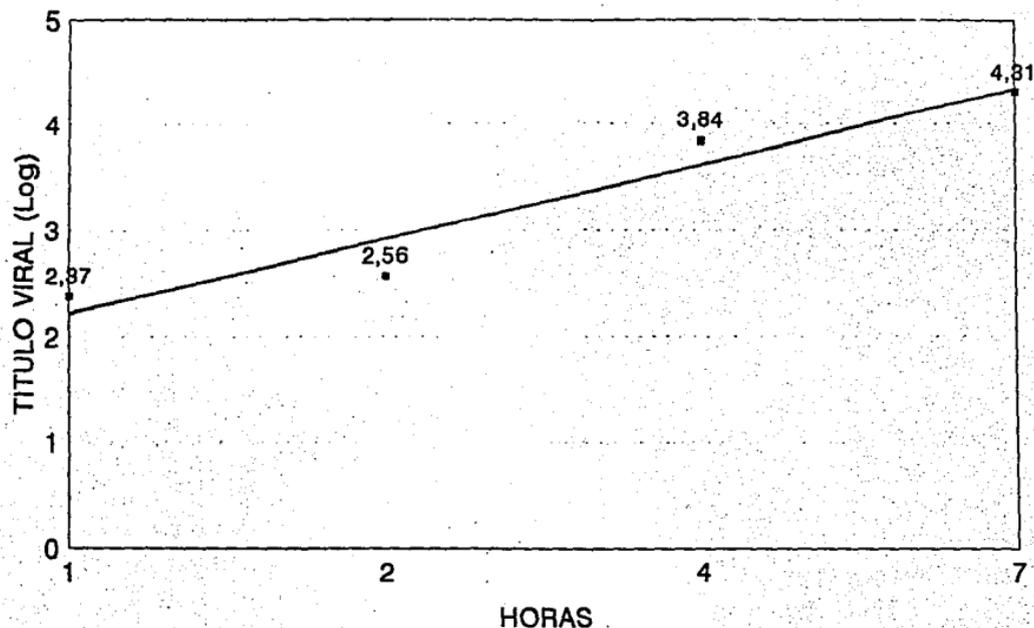
GRAFICA 10.- TENDENCIA DEL TITULO VIRAL DE LA VACUNA PAV-250 DE LAS 13 A LAS 18 HORAS, AL INOCULAR CON 325 UFFF 50%/0.2 ml



ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

→ TITULO OBTENIDO

GRAFICA 11.- TENDENCIA DEL TITULO VIRAL DE LA VACUNA PAV-250 DE LAS HORAS 1 A LA 7, AL INOCULAR CON 2,406 UFFF 50%/0.2 ml



—•— TITULO OBTENIDO

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Aiken, J. M.; Hoopes, K. H.; Rhodes, M. B. and Twiehaus, M. J.: Nonspecificity of fluorescent-antibody test for distinguishing Hog Cholera virus strains. J.A.V.M.A., 150: 59-61 (1967).
- 2.- Arias I., J.: Diagnóstico diferencial del CP. Síntesis Porcina, 2: 31-33 (1983).
- 3.- Aynaud, J. M.: Etude de la multiplication in vitro d'un clone du virus de la Peste Porcine. Rech. vétér., 1: 25-36 (1968).
- 4.- Aynaud, J. M. et Bibard, C.: Bilan de l'apport des techniques d'immunofluorescence dans le domaine de la Peste Porcine Classique. Cah. Méd. Vét., 40: 221-231 (1971).
- 5.- Baez R., U.; Coba A., M. A.; Anaya E., A. M.; Correa G., P.; Rosales O., C. y Angeles, L.: La cepa vacunal PAV-250 contra la Fiebre Porcina Clásica: empleo en cerdas durante la gestación y el celo. Reunión Nacional de Investigación Pecuaria Chihuahua 92, Chihuahua, México, 1992. p. 356. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos; y Patronato de Apoyo a la Investigación y Experimentación Pecuaria en México, México, D.F. (1992).

6.- Baez R., U. A.; Coba A., M. A.; Anaya E., A. M.; Correa G., P. y Rosales O., C.: Respuesta serológica a la vacuna contra la Fiebre Porcina Clásica (FPC) cepa PAV-250 al ser aplicada a cerdas durante la gestación y el celo. Reunión Nacional de Investigación Pecuaria Jalisco 1993, Guadalajara, Jal., México, 1993. p. 273. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos; y Patronato de Apoyo a la Investigación y Experimentación Pecuaria en México, México, D.F. (1993).

7.- Baez R., U. A.: Inocuidad del virus vacunal PAV-250 contra la Fiebre Porcina Clásica (FPC) en cerdas en celo y gestantes sin antecedentes de vacunación. Tesis de maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F., 1994.

8.- Baker, J. A.: Serial passage of Hog Cholera virus in rabbits. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 63: 183-187 (1946).

9.- Baker, J. A. and Sheffy, B. E.: A persistent Hog Cholera viremia in young pigs. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 105: 675-678 (1960).

10.- Benfield, D. A.; Collins, J. E.; Jenny, A. L. and Louia, T. J.: Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome. In: Diseases of Swine. Edited by: Leman, A. D.; Straw, B. E.; Mengeling, W. L.; D'Allaire, S. and Taylor, D. J. 756-762. Iowa State University Press, Ames, Iowa, U.S.A., 1992.

11.- Boynton, W. H.: Preliminary report on the propagation of Hog Cholera virus in vitro. Veterinary Medicine, **41**: 346-348 (1946).

12.- Bradley, R. and Done, J. T.: Nervous and Muscular Systems. In: Diseases of Swine. Edited by: Leman, A. D.; Straw, B. E.; Mengeling, W. L.; D'Allaire, S. and Taylor, D. J. 62-87. Iowa State University Press, Ames, Iowa, U.S.A., 1992.

13.- Cabrera T., A.: La campaña para el control y erradicación de la Fiebre Porcina Clásica en México. In: Avances en Producción Porcina. Editado por Morilla, A. Vol I, 231-242. Ediciones de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, A. C. (AMVEC), México, 1992.

14.- Calj, A.; De Smet, A.; Dubois, N. and Koenen, F.: High titre Hog Cholera virus production on Cytodex 3 microcarrier cultures. Arch. Virol., **105**: 113-118 (1989).

15.- Carbrey, E. A.; Stewart, W. C.; Kresse, J. I. and Lee, L. R.: Confirmation of Hog Cholera diagnosis by rapid serum-neutralization technique. J.A.V.M.A., **155**: 2201-2210 (1969).

16.- Coba A., M. A.; Baez R., U. A.; Anaya E., A. M.; Correa G., P. y Franco A., F. J.: Inmunización de lechones contra el Cólera Porcino (CP) aplicando la vacuna PAV-250 a los 1, 7, 15 y 21 días de edad. III Congreso Latino de Veterinarios Especialistas en Cerdos. II Congreso Nacional de la Sociedad Veterinaria Venezolana

de Especialistas en Cerdos, Venezuela, 1989. pp 31-32. Boletín de la Sociedad Veterinaria Venezolana de Especialistas en Cerdos, Maracay, Venezuela (1989)

17.- Coba A., M. A.; Baez R., U. A.; Anaya E., A. M. y Correa G., P.: Protección conferida por la vacuna PAV-250, contra la Fiebre Porcina Clásica al vacunar cerdos de uno, siete, 15 y 21 días de edad. Técnica Pecuaria en México, 30: 91-99 (1992).

18.- Coba A., M. A. y Correa G., P.: Diagnóstico de Fiebre Porcina Clásica (FPC) por la técnica directa de inmunofluorescencia. Boletín, CENID-Microbiología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, SARH., México, 1993.

19.- Colegio Nacional de Médicos Veterinarios Zootecnistas de México (CNMVZM) y Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH): Campaña Nacional contra el Cólera Porcino, Manual de Normas y Procedimientos. Programa de Acreditación de Médicos Veterinarios Zootecnistas. CNMVZM y SARH, México, 1990.

20.- Coles, E. M.: Veterinary Clinical Pathology. W. B. Saunders Company, Philadelphia and London, 1967.

21.- CONASA: Memoria de la Segunda Reunión Anual del Consejo Técnico Consultivo Nacional de Sanidad Animal. Campaña Nacional contra la Fiebre Porcina Clásica. México, 1993. pp. 53-55 y 326-332.

22.- Consejo Técnico Consultivo Nacional de Sanidad Animal. Comité de Fiebre Porcina y Enfermedad de Aujeszky. Decreto, SARH, Diario Oficial 27 de Septiembre de 1993, p. 17.

23.- Correa G., P.: Potencia de sueros y vacunas comerciales contra el Cólera Porcino (CP). Porcivama, 5: 4-9 (1978).

24.- Correa G., P.: Enfermedades Virales de los Animales Domésticos (Monogástricos), Vol. 1, 4a ed. Arte e Impresos B. J., México, 1982.

25.- Correa G., P.; Baker, J. A.; Sheffy, B. E.; Ochoa, M. C. y Mancisidor A., N.: Una nueva vacuna mejorada para controlar el Cólera del cerdo. Técnica Pecuaria en México, 29: 34-40 (1975).

26.- Correa G., P.; Anaya E., A. M.; Coba A., M. A. y Arriaga D., C.: Elaboración de un conjugado para el diagnóstico de la Fiebre Porcina Clásica (FPC) y comprobación de su especificidad y alto rendimiento. Prem. Canif. Ind. Far. Vet. 91, 1: 47-59 (1992)

27.- Correa G., P.; Coba A., M. A. y Anaya E., A. M.: Estabilidad durante 5 años del título viral de la semilla de la vacuna PAV-250, contra la Fiebre Porcina Clásica (FPC). Reunión Nacional de Investigación Pecuaria Chihuahua 92, Chihuahua, México, 1992. p. 350. Secretaría de Agricultura y Recursos Hídricos: y Patronato de Apoyo a la Investigación y Experimentación Pecuaria en México. México, D.F. (1992).

28.- Correa G., P.; Coba A., M. A. y Anaya E., A. M. Experiencias con la vacuna contra la Fiebre Porcina Clásica (FPC) PAV-250 de virus vivo atenuado. Symposium sobre Enfermedades del Cerdo con Implicaciones en el Comercio Internacional. Ciudad Universitaria, México D. F., 1992. pp. 90-99. Secretaría de Agricultura y Recursos Hídricos, México, D.F. (1992).

29.- Correa G., P.; Coba A., M. A.; Baez R., U. A. y Anaya E., A. M.: Protection conferred by PAV-250 Hog Cholera attenuated vaccine in 1, 7, 15 and 21 day old piglets. 12th International Pig Veterinary Society Congress. The Hague, the Netherlands, 1992.

30.- Correa G., P. y Ramírez N., R.: Cólera Porcino. In: Enfermedades de los Cerdos. Editado por Ramírez N., R. y Pijoan A., C. 51-78. México, 1986.

31.- Correa G., P.; Rodríguez S., B.; Romero R., C.; Sánchez H., C. y Snyder, M.: Prevención de la contaminación de los cultivos celulares (CC) por el virus de Diarrea Viral Bovina (BVD) mediante la inactivación y filtración del suero fetal de

temera comercial (SFTC) utilizado en los medios de cultivo. XV Congreso Nacional de Microbiología, Asociación Mexicana de Microbiología, Veracruz, Ver., México, 1984. p. 94.

32.- Correa G., P.; Rodríguez S., B.; Romero R., C; Torres C., G.; Sánchez H., C. y Snyder, M.: Prevención de la contaminación de los cultivos celulares (CC) por el virus de Diarrea Viral Bovina (BVD) mediante la inactivación con Gammas a 25 KGy del suero fetal de temera comercial (SFTC) utilizado en los medios de cultivo. V Simposio sobre Química Nuclear, Radioquímica y Química de Radiaciones, Salón del Consejo de la Universidad de Guanajuato, Guanajuato, Gto., México, 1984. p. 58.

33.- Cuevas, F. R.: Algunos conceptos sobre el Cólera Porcino con particular énfasis sobre su epizootiología y control. Porcira, 8: 31-38 (1988).

34.- Cumming, H.: Virología. Cultivo de tejidos. El Manual Moderno, S.A., México, 1975.

35.- Dunne, H. W. and Luedke, A. J.: The pathogenesis of Hog Cholera. II. The virus eclipse phase and sensitization of the host. Am. J. Vet. Res., 20: 619-624 (1959).

36.- Gillespie, J. H.; Sheffy, B. E. and Baker, J. A.: Propagation of Hog Cholera virus in tissue culture. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 105: 679-681 (1960).

37.- Gillespie, J. H.; Sheffy, B. E.; Coggins, L.; Madin, S. H. and Baker, J. A.: Propagation and attenuation of Hog Cholera virus in tissue culture. Reprinted from 69th Annual Proceedings United States Livestock Sanitary Association, U.S.A., 1961. pp. 1-10.

38.- Gillespie, J. H. y Timoney, J. F.: Hagan y Bruner, Enfermedades Infecciosas de los Animales Domésticos. 4a ed. La Prensa Médica Mexicana, México, 1983.

39.- Hayashi, N.; Kawakubo, A.; Matsuzawa, H.; Tomizawa, K. and Nakamura, J.: Propagation of Hog Cholera virus in tissue culture and its application to vaccine. I. Propagation of the virus in tissue culture. Am. J. Vet. Res., 21: 591-596 (1960).

40.- Heller, E.: Enhancement of Chikungunya virus replication and inhibition of Interferon production by actinomycin D. Virology, 21: 652-656 (1963).

41.- Lin, T. C.; Kang, B. J.; Shimizu, Y.; Kumagai, T. and Sasahara, J.: Evaluation of the fluorescent antibody-cell culture test for detection and titration of Hog Cholera virus. Nat. Inst. Anim. Hlth Quart., 9: 10-19 (1969).

42.- Loi, J. S.; Lim, G. H.; Chu, K. T. and Ng, M. K.: A micromethod for measuring Swine Fever antibody by neutralisation and immunofluorescence. Research In Veterinary Science, 40: 408-410 (1986).

43.- Matumoto, M.; Arita, M. and Oda, M.: Enhancement of measles virus replication by actinomycin D. Japan. J. Exp. Med., **35**: 319-329 (1965).

44.- Mengeling, W. L. and Drake, L.: Replication of Hog Cholera virus in cell culture. Am. J. Vet. Res., **30**: 1817-1823 (1969).

45.- Moennig, V.: The Hog Cholera virus. Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis., **15**: 189-201 (1992).

46.- Mussgay, M.: Peste Porcina. Informe de la Consulta FAO/CEE de expertos en la Erradicación de la Peste Porcina y la Peste Porcina Africana. Hannover, República Federal de Alemania, 1976, pp. 2-5.

47.- National Academy of Sciences-National Research Council: Methods for the examination of poultry biologics. 2nd ed. National Academy of Sciences-National Research Council, Washington, D. C., U.S.A., 1963.

48.- Oirschot van, J. T.: Hog Cholera. In: Diseases of Swine. Edited by: Leman, A. D.; Straw, B. E.; Mengeling, W. L.; D'Allaire, S. and Taylor, D. J. 274-285. Iowa State University Press, Ames, Iowa, U.S.A., 1992.

49.- Pejsak, Z.; Lipowski, A.; Markowska, I.; Dzierzawski, A. and Mokrzycka, A.: Immunogenicity and safety of the new attenuated Cellpest vaccine against Swine Fever. Medycyna Wet., **47**: 461-463 (1991).

50.- Pirtle, E. C. and Kniazeff, A. J.: Susceptibility of cultured mammalian cells to infection with virulent and modified Hog Cholera viruses. Am. J. Vet. Res., **29**: 1033-1040 (1968).

51.- Ramírez N., R.: Algunos aspectos clínicos del Cólera Porcino. In: Avances en enfermedades del cerdo. Editado por Morilla, A.; Correa, P. y Stephano, A. **77-79**. Ediciones de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, A.C., México, 1985.

52.- Ramírez N., R. y Sierra R., N.: La Enfermedad Misteriosa del Cerdo, "Mystery Disease", PRRS-SIRS. 1era. ed. Asistencia Técnica Veterinaria, S.A., México, 1992.

53.- Rapp, F. and Vanderslice, D.: Enhancement of the replication of measles virus by mitomycin C. The Journal of Immunology, **95**: 753-758 (1965).

54.- Rockborn, G.; Klingeborn, B. and Juntti, N.: Diagnostic Virology. Second part: Guidebook to procedures. Edited by J. Moreno-López, Sweden, 1990.

55.- Rodríguez H., G. A.: Epizootiología del Cólera Porcino. Porcrama, **11**: 7-18 (1987).

56.- Rosas C., N.: Contribución al estudio de la inocuidad, efectividad, difusión, titulación y antigenicidad de la vacuna comercial PAV-250 contra el Cólera Porcino.

Tesis de licenciatura. Esc. Nal. de Ciencias Biol. Instituto Politécnico Nacional.
México, D.F., 1983.

57.- Sandoval R., A.; Martell D., M. A.; Pizarro C., F. y Urquiza, F.: Pruebas de duración de inmunidad en cerdos vacunados contra el Cólera Porcino. Porcrama, **13**: 15-31 (1989).

58.- Scheffer, W. C.: Bioestadística. Fondo Educativo Interamericano, S. A., México, 1981.

59.- Solorzano, R. F.: A fluorescent antibody test for hog cholera. Thesis, Pensylvania State University, University Park. Ref. Abstract from Dissertation Abstracts, **23**: 4072 (1963).

60.- Szent-Iványi, T.: La Peste Porcina Clásica: nuevos métodos de control y erradicación. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., **3**: 507-525 (1984).

61.- Terpstra, C.: Hog Cholera: An update of present knowledge. Br. vet. J., **147**: 397-406 (1991).

62.- Wensvoort, G.: Epitopes on structural proteins of hog cholera (swine fever) virus. Proefschrift, Faculteit der Diergeneeskunde, Rijksuniversiteit, Utrecht, Netherlands, 1989.