

11680

1
2ej

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN**



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA



V N A M

**" FIEBRE PORCINA CLASICA:
INVESTIGACION ACTUAL Y PERSPECTIVAS DE UN DESARROLLO
TECNOLOGICO APLICADO AL DIAGNOSTICO SEROLOGICO "**

TESIS PRESENTADA PARA OBTENER
EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
(AREA: MICROBIOLOGIA)
POR
SUSANA ELISA MENDOZA ELVIRA

DIRECTORES DE TESIS:

DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO
DR. ELISEO HERNANDEZ BAUMGARTEN

1995

FALLA DE ORIGEN

Cuautitlán Izcalli, México.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

COMITE TUTORIAL

DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO

DR. ELISEO HERNANDEZ BAUMGARTEN

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO

DR. FRANCISCO TRIGO TAVERA

DR. CARLOS PIJOAN AGUADE

1991-2-1994-2

SINODALES

PRESIDENTE: DR. ELISEO HERNANDEZ BAUMGARTEN

PRIMER VOCAL: DR. CARLOS PIJOAN AGUADE

SEGUNDO VOCAL: DR. FRANCISCO TRIGO TAVERA

TERCER VOCAL: DR. ALVARO AGUILAR SETIEN

SECRETARIO: DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO

PRIMER SUPLENTE: DR. JAVIER OCADIZ GARCIA

SEGUNDO SUPLENTE: DR. PABLO CORREA GIRON

ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE VIROLOGIA DE LA COORDINACION GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO DE LA FES-CUAUTITLAN, EN EL CENID-MICROBIOLOGIA-INIFAP Y EN EL CENTRAL VETERINARY INSTITUTE (CDI) EN LELYSTAD HOLANDA.

**ESTE TRABAJO FUE APOYADO POR LA APROBACION DE 4
PROYECTOS DEL PROGRAMA DE APOYO AL POSGRADO (PADEP)
DE LA UNAM.**

PADEP-FCU-9121
PADEP-DFCU-9210
PADEP-100304
PADEP-100303

POR PARTE DE LA FES-CUAUTITLAN

CATEDRA: AFECCIONES BACTERIANAS Y VIRALES DEL CERDO.

DEDICATORIA

A mis padres, a mis hermanos, a mis sobrinas, a mis amigos, a mi tutor académico, a mis 33 años, al amor y a Dios.

AGRADECIMIENTOS A INSTITUCIONES NACIONALES

-INIFAP-CENID-Microbiología, Laboratorio de Virología a cargo del Dr. Pablo Correa, por la ayuda a estos Trabajos de Investigación, a Ma. Antonieta Coba por la búsqueda de las "cepas" de campo y al Laboratorio de Epizootiología a cargo del M.C. Germán Colmenares por su apoyo en la purificación del virus.

CENASA-SARH. Dr. Arturo Campomanes y Dr. Antonio Madrid, por la donación de la "Cepa" Ames de la FPC, además de los cultivos celulares.

AGRADECIMIENTOS VARIAS INSTITUCIONES DEL EXTRANJERO.

Al Instituto Central Veterinario (CDI) y a sus laboratorios de Referencia y de Investigación (de todo el País) en Lelystad, Holanda, a cargo del Dr. Catarinus Tersptra, por permitirme trabajar y realizar parte de mi investigación en su laboratorio bajo su dirección, a su grupo de trabajo (Lucianne, Erick, Rinus, Annelien) y a Auréa Labertté por todo su apoyo.

Al Laboratorio de Virología del National Veterinary Services Laboratories (NVSL), Ames-Iowa, a cargo del Dr. Carbrey, Dr. Joe Kresse, Linda Hourmung y Marsha Hengland y Romaine Ranger. Por las donaciones de reactivos, cepas y cultivos celulares.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA) y a sus laboratorios. Laboratorios de Referencia y de Investigación en Madrid-España, a cargo del Dr. Jose Manuel Sánchez Vizcaino. Por el Curso anual de "Inmunología de las Enfermedades Viricas".

Al IRTA en Barcelona España, a los Drs. Joan Pujols e. Ignacio Badiola por permitirme revisar con ellos las técnicas utilizadas en su laboratorio.

GRACIAS

A MIS PADRES (Antonia y Gabriel)

Por todos estos años de apoyo, de ternura y paciencia.

A MIS HERMANOS (Gaby, Bety, Dago y Rafa)
A LA FAMILIA PORTILLA-MENDOZA (Yoly, Hugo, Karen y Fanny).
A MIS CUÑADOS (Esmeralda, Mariano y Jesús).

Por estar siempre cerca de mi y compartir todos los momentos importantes de mi vida.

LOS AMO

GRACIAS

Al Dr. Keller por apoyar siempre el desarrollo académico, promoviendo siempre ser un buen "profesor".

Al Dr. Carlos Pijoan por estar tan lejos, tan cerca.....

Al Dr. Abel Ciprián Carrasco por sembrar un estudiante desde el servicio social y cosechar un profesionalista hasta obtener el grado de Doctor. Las palabras de gratitud no son suficientes para tratar de decir todo lo que se desea, pero por lo menos nos permite darnos una idea. Gracias Dr. Ciprián por siempre dirigirme acertadamente, con paciencia y determinación, formando finalmente a un profesor y a un investigador, pero sobre todo por enseñarme a nunca perder la calidad humana.

Al Dr. Eliseo Hernández Baumgarten, por recibir siempre su apoyo, su paciencia, y su protección.

LOS AMO

GRACIAS

A la FES-C por ser mi segunda casa.

A mi H. Comité Tutorial que semestre a semestre me fue evaluando pacientemente, aportando importantes comentarios al Proyecto de Investigación.

Al Dr. Alvaro Aguilar, Dr. Pablo Correa, Dr. Javier Ocadiz, Dr. Francisco Trigo, Dr. Carlos Pijoan que con paciencia revisó y corrigió, está tesis.

A Ignacio García por las excelentes búsquedas bibliográficas para este proyecto.

A Rodolfo Robles y Sofia González por su ayuda en el trabajo realizado en el microscopio electrónico de transmisión, a Jacobo Garibay, Rodolfo Robles y Rosario Venegas por su ayuda en la preparación del material fotográfico.

A Edgar Aguilera por su ayuda en el estudio electroforético y el de inmunotransferencia.

A Gabino Sánchez por ser mi angel de la guarda y a la Sra Amada Herrera y Andrea García por estar cerca de mi.

A. Rosa Ma. Bénéitez, David Trujillo, Minerva Romero por compartir conmigo la batalla diaria.

A Carolina Moreno e hijas académicas (Selene, Anita(s), Gaby, Lety, Claudia) Tonatiuh Cruz, Enrique Salas, Caro Segundo, Gilberto Ochoa, Luz Maria Ortega, Jorge Tórtora, Beatriz Agratti, Fernando Sotres, Sara Váldez, Andres Romero Rojas, Oscar Torres, Elvia Díaz, Lilia Eunice González, Manuel Fernández, Daniel Hernández, Stella Reginensi, Jorge Bermúdez, Clara Ines Alvarez, Elsa Flores Ignacio Vidal, José de Lucas, Miguel y Adriana Bonachea, Rocio Reyes, Yolanda López, Sra. Celia Galarza, Silvia Ruiz, Angélica Pérez, Teresa Ornelas y Gabriel Ayala por brindarme siempre su ayuda y amistad.

A mis hijos académicos

Horacio Lara, Natahliel Soto, Maritza Omaña, Dolores Hernández, Grisel Campos, Alfonso Zuñiga, Rafael Hernández, Martha Garcia, Roberto Resendiz, Rocio Pallares y Rosalino Vázquez, Catalina García, Teresa Hinojoza, por ser un excelente grupo.

Y a tantas personas que de una u otra manera me ayudaron.

LOS AMO

II. OBJETIVO GENERAL

ESTUDIAR EL COMPORTAMIENTO BIOLÓGICO, FISICOQUÍMICO, MORFOLOGICO Y MOLECULAR DEL VIRUS DE LA FIEBRE PORCINA CLASICA, PARA DESARROLLAR Y APLICAR UN MÉTODO DE DIAGNÓSTICO Y DETECTAR LOS ANTICUERPOS PRODUCIDOS POR LA VACUNACION Y DE SER POSIBLE, DIFERENCIARLOS DE AQUELLOS PRODUCIDOS POR LA INFECCION.

INDICE

	PAGS.
PROLOGO.....	i
<i>Curriculum vitae</i>	ii
RESUMEN.....	iii
SUMMARY.....	iv
1. INTRODUCCION GENERAL.....	1
2. OBJETIVO GENERAL.....	v
3. CAPITULO 1.....	53
3.1. RESUMEN.....	54
3.2. SUMMARY.....	55
3.3. INTRODUCCION.....	56
3.4. OBJETIVOS PARTICULARES.....	63
3.5. MATERIAL Y METODOS.....	63
3.6. RESULTADOS.....	67
3.7. DISCUSION.....	70
3.8. BIBLIOGRAFIA.....	72
4. CAPITULO 2.....	77
4.1. RESUMEN.....	79
4.2. SUMMARY.....	80
4.3. INTRODUCCION.....	83
4.4. OBJETIVOS PARTICULARES.....	84
5. MATERIAL Y METODOS.....	89
4.6. RESULTADOS.....	95
4.7. DISCUSION.....	98
4.8. BIBLIOGRAFIA.....	101
5. CAPITULO 3.....	102
5.1. RESUMEN.....	103
5.2. SUMMARY.....	104
5.3. INTRODUCCION.....	106
5.4. OBJETIVOS PARTICULARES.....	107
5.5. MATERIAL Y METODOS.....	110
5.6. RESULTADOS.....	125
5.7. DISCUSION.....	128
5.8. BIBLIOGRAFIA.....	130
6. CAPITULO 4.....	131
6.1. RESUMEN.....	132
6.2. SUMMARY.....	133
6.3. INTRODUCCION.....	134
6.4. OBJETIVOS PARTICULARES.....	134
6.5. MATERIAL Y METODOS.....	136
6.6. RESULTADOS.....	136
6.7. DISCUSION.....	142
6.8. BIBLIOGRAFIA.....	144
7. CAPITULO 5.....	145
7.1. RESUMEN.....	146
7.2. SUMMARY.....	147
7.3. INTRODUCCION.....	151
7.4. OBJETIVOS PARTICULARES.....	152
7.5. MATERIAL Y METODOS.....	154
7.6. RESULTADOS.....	181
7.7. DISCUSION.....	186
7.8. BIBLIOGRAFIA.....	186
8. CONCLUSIONES.....	191

La necesidad de seguir preparandose y adquirir conocimientos académicos es una parte inherente del ser humano para seguir actualizado. Agradezco la oportunidad que nos brinda la Universidad Nacional Autónoma de México, nuestra máxima Casa de Estudios, para realizar posgrados a bajo costo y un alto nivel académico, reconocido nacional e internacionalmente. El haber sido afortunada de ser aceptada en este Programa de Doctorado en Ciencias (área: Microbiología), me permitió estar siempre en contacto con los problemas reales de nuestro país, sin perder la dimensión de nuestros problemas y trabajar con las herramientas con las que contamos y que poco a poco se fueron consiguiendo gracias a los apoyos tan importantes como los del PADEP, del INIFAP-SARH y las donaciones de National Services Laboratories de Ames-Iowa, así como estancias cortas para asistir a: un Curso sobre "Enfermedades Viricas del Cerdo, en el Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA), Madrid-España, y por otro lado al Central Veterinary Institute de Lelystad-Holanda a cargo del Dr. Terpstra y su grupo de trabajo, que permitieron que trabajara con ellos durante un tiempo donde además de avanzar en mi tesis logré comprobar que nuestro nivel se encuentra a la altura de investigadores del extranjero.

Otro punto importante es que además de pertenecer al Sistema Nacional de Investigadores (SNI) también fui aceptada como Miembro del Comité en Fiebre Porcina Clásica y Enfermedad de Aujeszky. Además como Miembro del Comité en Enfermedades Infecciosas de los Porcinos, en el Comité Nacional de Salud Animal (CONASA).

El proyecto de doctorado propuesto fue aceptado para un nuevo Programa de Doctorado (según el No. 4, inciso c, de las normas complementarias), el cual fue evaluado y aprobado el día 7 de Noviembre de 1991, por el Comité Tutorial. A lo largo de este período se realizaron una serie de actividades complementarias, según el semestre de avance.

El concluir este ciclo y obtener el último grado académico en nuestra Máxima Casa de Estudios (UNAM) es un gran honor, pero además, tengo el orgullo de ser la **primera alumna egresada** de este Programa de Doctorado en Ciencias (área: Microbiología), el cual fue aprobado, por el Consejo Universitario en Septiembre de 1991.

Curriculum Vitae

Es difícil escribir una reseña curricular y encontrar adjetivos adecuados, pero escribir acerca de la Mtra. Susana E. Mendoza Elvira es más difícil. No hay adjetivos para describir con precisión su magnífica trayectoria académica. Afortunadamente, los hechos hablan por sí mismos. Mis más amplias felicitaciones y mi agradecimiento por permitirme este espacio.

Susana Elisa Mendoza Elvira nació el 23 de Febrero de 1962, en la Ciudad de México. Realizó los siguientes estudios: Técnico Químico Clínico Laboratorista; Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo (FES-C), Maestría en Ciencias (área: Microbiología) en la FESC. Ingresó a la Coordinación General de Estudios de Posgrado (Laboratorio de Virología) de la FESC-UNAM como Ayudante de Profesor "B" en 1985; posteriormente en 1989 logró obtener tiempo completo como Profesor de Asignatura "A". Ha desempeñado labores académico-administrativas: en Junio de 1993 fue designada Coordinadora del Posgrado en Microbiología y en Mayo de 1994, Secretaria Técnica de Posgrado, cargos en los que continúa hasta la fecha. Concurrió por examen de oposición para obtener la definitividad en la asignatura de Virología Diagnóstica obteniendo el resultado de Ganadora.

Logró 4 desarrollos tecnológicos en colaboración con el Dr. Abel Ciprián. Ha concursado, en diferentes ocasiones, con 6 trabajos en el Premio CANIFARMA (área: Veterinaria), en los que ha obtenido dos menciones honoríficas. Ha presentado más de 160 trabajos de investigación, los cuales han sido publicados por los organizadores de las reuniones científicas y profesionales en las que participó; de esos trabajos de investigación, 14 son de relevancia internacional (Holanda, Cuba, Tailandia, Uruguay, Italia y México). Ha presentado 7 trabajos en congreso por invitación especial. Ha publicado 18 artículos de divulgación en revistas nacionales con arbitraje; 14 artículos de investigación en revistas con arbitraje, nacionales e internacionales; tiene 6 capítulos en libros, 1 libro como autora y 5 como editora. Por otro lado, ha impartido más de 70 Conferencias en congresos y reuniones de investigación. Ha tomado 28 cursos cortos de actualización y 5 cursos largos de actualización. Ha tenido entrenamientos en el área de Virología Veterinaria en el extranjero: una en Madrid-España, uno en Barcelona-España, dos en Ames, Iowa-USA, y una en Lelystad, Holanda. Pertenece a 6 asociaciones y 19 comités. Ha impartido 18 conferencias en seminarios y cursos. Ha obtenido la aprobación de 11 proyectos de investigación (PADEP; CONACyT y Cátedras). Ha logrado 29 distinciones entre las cuales destacan: Medalla de plata Gabino Barreda a la trayectoria en la Maestría en Ciencias (Microbiología) en 1990, dos menciones honoríficas otorgadas por CANIFARMA en 1992 y 1993, Premio

del "Jabalí Dorado" a la mejor investigadora en 1993, otorgado por la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos (AMVEC); Premio al Mejor Trabajo Técnico, otorgado por ATAM en 1993; Premio de la Asociación Argentina de Químicos Cosméticos otorgado por Fabriquímica en 1993-1994; Primer lugar "Premio Gustavo Baz Prada" por Servicio Social (área: Investigación); becaria del CONACyT y de la Embajada Española; candidata a investigadora en el SNI, desde 1990; nombramiento oficial, por el Presidente de AMVEC, como Secretaria General del AMVEC; evaluadora del CONACyT.

Por otro lado, ha organizado 16 cursos de alto nivel en el área de microbiología. Ha sido responsable de la formación de recursos humanos en los niveles de licenciatura y posgrado. Es tutora de 5 estudiantes de maestría; ha dirigido 9 tesis de licenciatura terminadas, 3 en proceso y tiene 5 tesis de maestría en proceso. Ha formado a 7 estudiantes del CONALEP, 2 estudiantes de Jóvenes a la Investigación y 32 estudiantes de Servicio Social de la FES-C, entre otras cosas.

José Luis Aguilera Fuentes
Coordinador del Comité Editorial/Editor de la FESC-UNAM

Se analizó al Virus de la Fiebre Porcina Clásica (VFPC), por medio de cinco experimentos para estudiar las diferencias entre las "cepas" de campo, de referencia y vacunales. Se determinaron sus comportamientos de replicación en los cultivos y se evaluaron por titulación. De las 17 "cepas" estudiadas se seleccionaron 6 "cepas" (de campo, vacunales y de referencia), siendo éstas las más importantes por los resultados obtenidos con anticuerpos monoclonales. Se realizaron con estas "cepas" del VFPC estudios comparativos de densidad boyante y estudios de espectroscopía en ultravioleta (UV). Así mismo, se determinó la presencia de partículas virales por microscopía electrónica en las fracciones correspondientes de los picos previamente determinados por el espectro en U.V. También se utilizaron anticuerpos monoclonales dirigidos a la glicoproteína de la envoltura viral, para encontrar diferencias entre las "cepas" de campo, vacunales y de referencia, de varias partes del mundo. La cepa PAV-250 es la de elección para ser utilizada como antígeno en el diagnóstico serológico diferencial con las "cepas" de campo analizadas. Se les realizaron estudios por la técnica de electroforesis, a las fracciones separadas de las seis "cepas" encontrándose proteínas importantes como son las glicoproteínas E1, E2, de la cápside y la gp 31. Por último se realizó la prueba de Inmunotransferencia con sueros de animales de diferentes lugares de la República Mexicana, mostrando que las "cepas" de campo en realidad son de campo y no de algún brote relacionado con vacunación, también se encontró que una cepa de campo y una vacunal (PAV-250), pueden utilizarse como "cepas" marcadoras para tratar de diferenciar entre los anticuerpos vacunales y los anticuerpos producidos contra la infección. En este estudio que duro 4 años, se logró encontrar las proteínas, las fracciones y las "cepas" que permitieran continuar con el estudio y llegar finalmente a la diferenciación de los mencionados anticuerpos. Otro aportación que dio esta investigación es que las "cepas" vacunales, de campo y la de referencia, que fueron obtenidas en diferente formas, (ya que las primeras se compraron en farmacias veterinarias y las segundas y terceras fueron donaciones). Encontrándose de primera instancia que tenían buenos títulos, sobre todo las vacunales que se utilizan comercialmente. Después, al enfrentar estas "cepas" a los anticuerpos monoclonales, resultaron positivas al VFPC y no estuvieron contaminados con el virus de la Diarrea Viral, ni con el de la Enfermedad de la Frontera ("Border Disease"). Por otro lado el trabajar con "cepas" vivas sabemos que puede ser un problema ya que la virulencia de las "cepas" puede revertir; sin embargo hoy en día se ha logrado controlar este problema realizandose pruebas de inocuidad y de demostración de que no se transmiten, encontrándose que son vacunas inocuas y que no se diseminan.

La información obtenida en este estudio, muestra los resultados de diferentes "cepas", lo contrario a los resultados de los holandeses que sólo trabajaron con una "cepa" la BRESCIA. También se tuvo la oportunidad de enfrentar estas "cepas" a sueros provenientes de diferentes lugares en distintos momentos de la Campaña de Erradicación de la FPC. En Holanda se ha estudiado también más a la "cepa" China que es lapinizada y no una "cepa" viva con capacidad de replicarse en cerdos, lo que para este estudio también fue importante ya que en México contamos con varias vacunas vivas en forma comercial. Finalmente aunque en este momento se encontró las proteínas importantes, se deberán realizar estudios complementarios para estar seguros de está información y validar el sistema de diagnóstico.

1. INTRODUCCION GENERAL

1.0 VIRUS DE LA FIEBRE PORCINA CLASICA

1.1 Introducción

El virus de la Fiebre Porcina Clásica, (VFPC) (sinónimias: Hog Cholerae; Swine Fever, Cólera Porcino; Fiebre Suina Clásica), puede presentarse con un curso subagudo, crónico o clínicamente inaparente. El porcentaje de mortalidad puede tener un rango cercano al 100%. Bajo ciertas circunstancias naturales el cerdo es el único animal que se infecta. El primer brote fue reportado en Ohio, USA a principio de 1830. En el presente, esta enfermedad se encuentra mundialmente distribuida. En las últimas décadas algunos países como USA, Canadá y Gran Bretaña han tenido un éxito rotundo en la erradicación de la enfermedad. En algunos países donde el VFPC es enzoótico, la enfermedad provoca importantes pérdidas económicas.

La Fiebre Porcina Clásica (FPC), es una enfermedad infecciosa producida por un virus altamente transmisible y de rápida diseminación, se transmite principalmente a través de secreciones y excreciones nasales, lagrimales, orina, heces y mecánicamente, así como por moscas, pájaros, utensilios, desperdicios de alimento y comida, y por transmisión; y que tiene alrededor de 100 años en México.

Su presencia, ha provocado importantes pérdidas a la porcicultura nacional además del impacto negativo en la exportación de carne y otros subproductos derivados de esta importante especie pecuaria.

El hecho de que el país no haya logrado erradicar esta enfermedad, ha limitado la exportación, ya que los países que constituyen potencialmente el mercado externo de carne de cerdo, generalmente ya están libres de FPC, y por ello tienen prohibida la compra de estos productos a países en los que esta virosis está presente; y este es un factor determinante en las mesas de negociaciones de los tratados de Libre Comercio que México ha firmado y/o firmará con diferentes países.

Entre los tratados que se han firmado se encuentran el Trilateral (México-Estados Unidos-Canadá); están por firmarse el de la cuenca del Pacífico con los países Asiáticos industrializados, el Bilateral con Chile, el pacto Caribeño y el trilateral del sur (México-Venezuela-Colombia).

De todos estos países, la mitad ya ha erradicado la Fiebre Porcina, por lo tanto serán vendedores de cerdos para nuestro país y limitarán la importación de animales provenientes de México, por temor a la introducción de un problema sanitario como lo es la FPC.

Como podrá apreciarse la Industria Porcina Nacional siempre ha estado amenazada por la presencia de esta enfermedad, cuyos estragos son ya no tanto sanitarios, sino económicos, al dificultar o impedir las transacciones comerciales internacionales.

1.2 LA FIEBRE PORCINA CLASICA EN MEXICO (COLERA PORCINO)

1.2.1 HISTORIA Y DISTRIBUCION MUNDIAL

La Fiebre Porcina Clásica se origino en el Norte de América (1810-1833) en Tennesse y Ohio. En Europa apreció en Francia e Inglaterra (1822-1962); en Sudamérica (1899) y en Sudafrica (1900) (Ramírez y Reynoso, 1993).

Durante ese tiempo los países de Europa comienzan a tomar medidas de control, aún desconociendo el agente etiológico y la epidemiología, como fue el caso del Reino Unido que prohibió la importación de cerdos vivos del continente Europeo desde 1882. Conforme se tuvo conocimiento de la naturaleza de la FPC, las medidas simples restrictivas consistieron en prohibir la importación, como sucedió en Dinamarca (1933), Irlanda (1958), Reino Unido (1966), Hungría (1972) y Estados Unidos (1976).

1.2.2 LA FPC EN MEXICO.

La Fiebre Porcina Clásica (FPC) fue introducida al país en el año de 1877 a través de la importación de pie de cría procedente de los Estados Unidos de Norteamérica. (Cabrera, 1991).

Otros países prefirieron proteger la población de cerdos vacunando contra la FPC. A partir de 1973, se establece en México un programa formal para el control y erradicación de esta enfermedad en la región Noroeste, pretendiendo abarcar los Estados de Baja California, Baja California Sur y Sonora. Las estrategias y conceptos de este plan, así como el conocimiento e información de la importancia de la Fiebre Porcina Clásica, propiciaron el inicio del Programa de Erradicación en el Norte del Estado de Sonora, así como un programa intensivo de control en el Sur del Estado (1978) (Cabrera, 1991).

Esta situación, junto con la amenaza que representó para México la presencia de la Peste Porcina Africana en países del Caribe (Haití, República Dominicana y Cuba) y en Sudamérica (Brasil), motivaron la necesidad de implementar con carácter obligatorio y permanente la Campaña Nacional contra la Fiebre Porcina Clásica, la cual oficialmente quedó establecida el 25 de marzo de 1980. (Cabrera, 1991). A partir de esta fecha se aplicaron programas anuales de vacunación en varios Estados, habiéndose logrado en 1983 liberar de esta enfermedad los 58 Municipios de la zona Norte del Estado de Sonora.

Durante la década de los 80's la Campaña entró en un estado de latencia, provocado básicamente por la severa crisis que atravesó el país, aunado a la desaparición de los servicios veterinarios oficiales de Sanidad Animal.

Es a partir de 1990 que la Campaña se restablece con la reincorporación de la Dirección General de Salud Animal y desde entonces los avances han sido significativos. Se ha logrado liberar de esta enfermedad los Estados de Baja California, Baja California Sur, y el Sur de Sonora (11 Municipios) en 1991; Chihuahua y Sinaloa en 1993; e incorporar a la fase de erradicación a Nuevo León y Yucatan ese mismo año. (Cabrera, 1991).

En la actualidad, el programa que presenta México, con respecto a la Campaña contra la Fiebre Porcina Clásica, es sin lugar a duda muy favorable e indicativo de un gran esfuerzo llevado a cabo por los productores, el Gobierno Federal, los Gobiernos Estatales, industriales y otros organismos vinculados con la actividad porcícola del país.

Las zonas libres, como ya se indicó, están integradas por los Estados de Baja California, Baja California Sur, Chihuahua, Sinaloa y Sonora, lo que representa el 32.06% del territorio nacional, el 13.7% de la población porcina y el 18.36% de la producción. Actualmente las actividades que se realizan en estos estados son básicamente vigilancia epizootiológica, control estricto de la movilización de cerdos, productos y subproducto de origen porcino provenientes de zonas de control y constatación de la ausencia de la enfermedad a través de muestreos serológicos. (Cabrera, 1991).

Las zonas de erradicación comprenden de los Estados de Nuevo León y Yucatan, que representan el 5.5% del territorio, el 4.% de la población y el 4.3% de la producción.

Los Estados de Campeche, Quintana Roo, Tabasco y Tamaulipas se encuentran en la última etapa de la fase de control. Estos estados comprenden el 18.09% del territorio, el 5.62% de la población y el 3.37% de la producción.

Con respecto a Campeche, Quintana Roo y Tabasco, el proyecto de erradicación para la zona del Sureste, contempla su incorporación antes de finalizar 1993.

Por otra parte, los Estados de Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Puebla, Querétaro y Tlaxcala, se han incorporado a la fase intensiva de control, en la cual las actividades fundamentales han consistido en la vacunación masiva de los cerdos, la vigilancia epizootiológica, notificación diagnóstico y control de brotes de Fiebre Porcina Clásica, así como el control de la movilización de cerdos desde su origen hasta su destino. La región se caracteriza por ser el área de mayor población porcina (43.7%), así como de la más alta producción (55.1%), aunque en términos de territorios sólo representa el 13.6%.

Es importante señalar que esta región es considerada la zona endémica primaria para la Fiebre Porcina Clásica, de tal suerte que cobra una gran importancia desde el punto de vista epizootiológico por la comercialización y movilización de cerdos entre estos estados y hacia otras entidades.

Por último, el resto del territorio nacional, que incluye los estados de Aguascalientes, Chiapas, Durango, Colima, Distrito Federal, Guerrero, Nayarit, Oaxaca, San Luis Potosí, Veracruz y Zacatecas, se encuentran en fase de control. Estos representan el 30.7% del territorio, el 31.5% de la población, pero sólo el 17.5% de la producción. Estos Estados se han caracterizado por presentar brotes esporádicos de la enfermedad, sin embargo, cabe señalar que las acciones de vacunación han sido hasta la fecha poco significativas. Por lo tanto, se pretende que para el año de 1994 algunos de estos estados inicien la fase intensiva de la Campaña.

La ausencia de sistemas adecuados para el control de la movilización de cerdos, de prácticas de bioseguridad de las explotaciones pecuarias y de biológicos seguros y eficaces, favoreciendo la difusión del padecimiento en amplias zonas del país, especialmente en los estados del centro, tradicionalmente los de mayor población porcina (Ramírez y Reynoso 1993).

A partir de 1973, se inicio la estructuración de un programa en el noroeste que se denominó "Programa Nacional para el Control y la Erradicación del Cólera Porcino", cuyas características principales fueron: efectuar el programa por etapas y regiones de acuerdo con los diferentes sistemas de explotación porcina del país aprovechando los adelantos ya existentes en algunas regiones; en este programa de erradicación se contemplaron factores de suma importancia como es la reducción de la incidencia, a través de programas de vacunación, el establecimiento de un alto nivel de educación sanitaria en los productores y el control efectivo de la movilización de cerdos y sus productos (Ramírez y Reynoso, 1993).

En la primera etapa se consideró la estrategia de un programa de Erradicación que se desarrollaría en los estados de Baja California Sur, Sonora, Chihuahua, Coahuila, Nuevo Leon, Tamaulipas y un plan de control en el resto del país.

Todos estos conceptos y estrategias se fueron madurando y modificando, a la vez que se obtenía mayor información sobre la situación de la FPC hasta, que el 10 de junio de 1978 se inició en forma oficial la Campaña de Erradicación en el Norte del estado de Sonora y un programa intensivo de control en el Sur de este mismo estado y en el estado de Sinaloa.

Esta situación junto con la amenaza que representó para nuestro país la presencia de la Peste Porcina Africana en países del Caribe y Sudamérica, propiciaron y apoyaron las necesidades de extender la Campaña con algunas modificaciones y estrategias para que se ampliara y desarrollara en todo el país, contando ya con presupuesto propio a partir del mes de Septiembre de 1978.

A partir de la publicación en el Diario Oficial de la Federación 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, declarandose libre 58 municipios del Norte de Sonora el 10 de Enero de 1983.

A partir de esta fecha la Campaña entra en un estado de latencia motivada por la severa crisis económica por la que atravesó el país durante casi una década y no es sino hasta principios de la década de los 90's cuando la Campaña contra Fiebre Porcina Clásica se reimpulsa con la recreación de la Dirección General de Salud Animal que había desaparecido prácticamente en la década de los 80's. Es a partir de Mayo de 1990 que a través de la Dirección de Campañas Zoonositarias se plantean las estrategias más congruentes con las limitaciones económicas y con las políticas de coparticipación y corresponsabilidad marcadas por el Ejecutivo Federal del país, esto permitió el arranque de acciones de campañas mas lógicas menos onerosas y mas efectivas al participar en su planeación autoridades Estatales, Federales, Productores, Industriales, y Veterinarios especializados. Actualmente los países libres de Fiebre Porcina Clásica son: Australia, Canadá, Estados Unidos, Irlanda, Islandia, Japón, Nueva Zelanda, Reino Unido, Suecia y los países Escandinavo (Ramírez y Reynoso, 1993).

1.2.3. CAMPAÑA CONTRA LA FIEBRE PORCINA CLASICA.

Una de las enfermedades que más pérdidas económicas ocasiona a los productores de cerdos es la Fiebre Porcina Clásica, por lo que consideramos importante dar a conocer los avances y la situación actual que guarda la Campaña Nacional contra la FPC (Cabrera, 1994).

En los dos últimos años la Campaña Nacional contra la FPC, ha tenido mayor fuerza, actualmente ya contamos con tres estados libres de FPC que son Sonora, Baja California Norte, Baja California Sur, declaradas zona libre en el Diario Oficial de la Federación de fecha 16 de octubre de 1991 (Ramírez y Reynoso 1993).

En el caso de los estados de Sinaloa y Chihuahua, ya fueron integrados a la fase de erradicación. Y en el sureste del país, que comprende los estados de Tabasco, Campeche, Yucatán y Quintana Roo, en 1990 se estableció un programa a nivel regional para el control de la FPC y esta a punto de ser finalizado, lo cual dará acceso a esta zona a la fase de erradicación del país, por otro lado se tiene al Bajío, Queretaro y Estado de México, también en este año se ha implementado un programa operativo regional con grandes logros; sin embargo en esta parte del país se tienen que realizar algunos ajustes para que el programa avance, pero prácticamente podríamos pensar que se encuentra en la fase de control. En la zona noreste del país, que comprende Nuevo León, Tamaulipas y Coahuila, también se ha iniciado algunos programas en años anteriores, lo cual posibilitará que estos estados entren a la fase de erradicación. Estas entidades solicitaron a la SARG su ingreso a la fase erradicación, ya que en dos años no se han presentado casos de FPC, lo que les permite al igual que la zona de sureste, ingresar a la fase de erradicación en este año. En el resto del país concretamente en los estados de Puebla, Tlaxcala y Estado de México, se pretende establecer un método intensivo de campaña, donde productores, autoridades y la SARH, sumen esfuerzos en la zona centro. En el caso de Tlaxcala y Puebla se integran a la fase de control, así como al control de la movilización de animales y productos derivados. En la zona sur encontramos los estados de Guerrero, Chiapas y Oaxaca que están contemplados y programados para iniciar la fase de control el próximo año. Actualmente se vienen realizando vacunaciones, pero dadas las condiciones específicas de la porcicultura en esa región, tenemos problemas para su integración; sin embargo, en Oaxaca, específicamente en la zona de la Mixteca, empezó el programa de vacunación con vías a implementar un programa

integral en toda la zona, por otro lado en Chiapas se concertaron acciones para establecer un programa bilateral, y con la República de Guatemala, para que en la franja fronteriza se instale un programa de vacunación y de vigilancia, con tendencias a la erradicación en esa parte del país. Con esas acciones estamos reforzando la campaña contra la FPC en esta zona. En los estados de Hidalgo, Veracruz, San Luis Potosí, Aguascalientes y Zacatecas, también se implementaran algunos programas a nivel regional, a fin de que el próximo año se tengan integrados a todos los estados de la República en la campaña contra la FPC. La campaña está integrada por 3 fases que son: de control, erradicación y libre. En la fase de control, se lleva a cabo la vacunación intensiva de los cerdos, tanto de las explotaciones tecnificadas como en las de traspatio. Esto con la finalidad de tener una mayor cobertura de cerdos vacunados. Por otro lado se tiene el control de la movilizaciones a través del mecanismo de solicitud y presentación de documentos, certificados y guías sanitarias, en los lugares de matanza.

Estas son las acciones que se han implementado en los estados en donde se ha iniciado la campaña en forma intensiva; asimismo la vigilancia, el diagnóstico y la notificación de casos reportados y la prevalencia de la enfermedad en estas zonas hace resaltar la importancia de la participación del MVZ. Para que esta campaña marche bien, se estableció el programa de acreditación de Médicos Veterinarios Zootecnistas, para lo cual se han impartido cursos de acreditación para que los veterinarios acreditados puedan participar activamente en la Campaña Nacional de FPC y de la Enfermedad de Aujeszky. Actualmente se encuentra con 500 veterinarios acreditados, ubicados en 21 estados de la República, en áreas porcícolas donde se concentra la mayor población de cerdos. La acreditación es un programa que va a permitir contar con los recursos humanos a nivel operativo para que la campaña pueda avanzar satisfactoriamente. Los porcicultores deberán tomar la iniciativa y estar conscientes de que el Veterinario es el elemento mediante el cual podrá realizarse la certificación de la vacunación. Para el control de la movilización es indispensable contar con la guía sanitaria, para lo cual se deberá contar con un certificado de vacunación, expedido por un MVZ acreditado o por un MVZ oficial de la SARH. (Ramírez y Reynoso 1993).

Cuando se ha pasado la fase de control y la enfermedad no se ha presentado en un año, esa región estará en posibilidad de pasar a la fase de erradicación. Para lo cual se debe contar con elementos de seguridad en las entradas de los estados, en este caso casetas de vigilancia bien

equipadas, en donde no se permitirá el acceso de animales en pie, ni a subproductos derivados que provengan de zonas que se encuentren en la fase de control. Esta es una de las acciones de la fase de erradicación. Asimismo la suspensión de la vacunación es un factor que preocupa al productor, pero deberá asegurarse que ningún producto o subproducto porcino, por lo que se le dará seguridad y tranquilidad para que ya no tenga que aplicar la vacuna. Por otro lado cabe señalar que ya existe un seguro por parte de AgroAsemex para proteger el patrimonio de los productores interesados en asegurar su ganado contra la FPC al suspender la vacunación. Por último se han esperado 2 años para que esta región se integre como zona libre. Entonces se realiza un muestreo lo más representativo de los porcinos del lugar, para garantizar que el virus de la FPC no existe circulando por la zona y que de esta forma, dicha area se encuentra libre de esta enfermedad. El control de la entrada de productos y animales se hacen más estricto, y se intensifica la vigilancia y el control de cualquier caso sospechoso de FPC. (Cabrera, A., 1991; Ramírez y Reynoso, 1993).

1.3. GRUPO DE VIRUS QUE PERTENECEN A LA FAMILIA TOGAVIRIDAE

El nombre de los togavirus proviene del latin toga=envoltura, presenta una envoltura que cubre al corazón de la nucleocapside isométrica. La familia Togaviridae esta representada por cuatro generos alphavirus, rubivirus, pestivirus y arterivirus; los flavivirus se han asignado a una familia independiente. Existen mas de 25 miembros en el genero alfavirus mientras que los rubivirus y los arterivirus contienen unicamente uno (virus de la rubiola y virus de la arteritis equina). El genero de los pestivirus esta representado por enfermedades mucosales como es el Virus de la Diarrea Viral Bovina (BVDV), que esta estrechamente relacionado con la enfermedad de Border, en borregos y la Fiebre Porcina Clásica en cerdos (Pensaert, 1989).

Los Togavirus son virus RNA, pequeño(40-70 nm) y envueltos. La envoltura se encuentra fuertemente unida a la nucleocapside esferica de un diametro de 25-37 nm, de simetria icosaedrica. Las proyecciones de la superficie han sido demostrables en la mayoria de los togavirus (Pensaert, 1989).

El ácido nucleico de los Togavirus se caracteriza por ser un RNA de cadena sencilla de una molécula simple de sentido positivo, un RNA de cadena sencilla con un peso molecular de aproximadamente 4×10^6 . La secuencia de algunos alfavirus son conocidos y algunas secuencias de los pestivirus se han obtenidos. El virion contiene de tres a cuatro polipeptidos y uno o más de ellos se encuentran glicosilados (Persaert, 1989).

La densidad boyante es de 1.25 g/cm^3 en sacarosa. El coeficiente de sedimentación se encuentra entre 150 S (Pestivirus) y 300 S han sido reportados.

La replicación de los Togavirus se lleva a cabo en el citoplasma y madura por liberación después de un preensamblaje o un ensamblaje de nucleocapside a través de la membrana plasmática. Durante la reapiación de los alfa y de los rubivirus un RNA subgenómico 26 S es sintetizado, el cual contiene la información para las proteínas estructurales del virión. Los arterivirus producen 5 RNAs mensajeros subgenómicos como una protección hacia ellos (Pensaert, 1989).

Recientes estudios sobre la organización genómica y estrategias de transcripción incluyen a los pestivirus y los arterivirus dentro de la familia Togaviridae. En contraste con los alfavirus, los pestivirus falta la poliadenilación del RNA genómico como una especie de un RNA mensajero subgenómico y que tiene su proteína de virion codificando la secuencia cerca de 5' al final del genoma (Pensaert, 1989).

1.4. PROPIEDADES VIRALES

El VFPC es resistente a tratamientos físicos y químicos, es parcialmente dependiente del estado físico del material que contiene el virus. Por ejemplo el VFPC en fluidos de cultivos celulares es inactivado en 10 min a 60 C (Kubin, 1967), mientras que la infectividad no es destruida en la sangre desfibrinada a una temperatura de 68 C por 30 min (Torrey y Prather, 1963). El VFPC es estable a un amplio rango de pH, pero entre el pH 4 el cercano a 10, su infectividad se ve debilitada. El VFPC se inactiva rápidamente con solventes como el cloroformo y el ether, por que el virión contiene lípidos en su envoltura. El virus puede permanecer infeccioso por meses en cerdos y subproductos de cerdos, un factor epizootológico importante. En el medio ambiente aparece en virus en un par de días es inactivado por el hidróxido de sodio al 1% el cual es considerado como un buen desinfectante para las superficies contaminadas VFPC .

Los cultivos celulares de riñon de cerdo son frecuentemente utilizados para el aislamiento y crecimiento del VFPC. El virus no causa efecto citopático y se replica unicamente en el citoplasma de la célula. El antígeno viral puede ser detectado a partir de las 4 hrs después del periodo de incubación mediante la técnica de los anticuerpos fluorescentes (Mengeling y Drake, 1969), a las 5 hrs del periodo de incubación la primera progenie empieza a liberarse. Bajo condiciones simples de ciclo de recuperación, hay una parte exponencial incrementada en el título viral a las 15 hrs del período de incubación, después la producción de virus continua por algunos días alcanzando algunos picos entre 10^7 y 10^8 UFP (Aynaud, 1968). En cultivos celulares los virus se distribuyen por la vía del medio y también mediante los puentes citoplasmáticos intercelulares y de célula madre a célula hija durante la mitosis. Se ha establecido que los cultivos celulares infectados con el VFPC, persisten. Los estudios de microscopia electrónica sugieren que los virus maduros estan sobre la membrana introcitoplasmática. Estas evidencias son apoyadas por la inhabilidad para detectar antígenos de VFPC sobre la superficie de las células infectadas (Van Oirschot, 1980).

Pirtle y Mengeling, 1971 han encontrado variaciones antigénicas entre las "cepas" de VFPC; encontraron que 2 "cepas" de VFPC fueron neutralizadas en alto grado por su antisuero homólogo así como por un antisuero heterólogo. Corthier *et al* (1974) encontraron evidencia de subgrupos serológicos, en base a diferentes grados de neutralización de varios antisueros de BVD. El estudio reveló que existen un grupo de "cepas" virulentas y de "cepas" atenuadas, mientras que en otro grupo se incluyen "cepas" moderadamente virulentas y de baja virulencia. Kamijyo *et al* (1977) también distinguió 2 subgrupos antigénicos y un grupo de virus aparentemente más virulento.

El virus de la FPC está estrechamente relacionado antigénicamente con el virus de BVD. Estos virus dan reacciones cruzadas en las pruebas de inmunodifusión y de inmunofluorescencia, y algunas "cepas" también con el Ensayo de Neutralización. La inmunización de cerdos con DVB puede conferir protección contra el desafío de una cepa virulenta del VFPC. Ocasionalmente los pestivirus los cuales son difíciles de identificar y diferenciar uno de otro (VFPC y DVB), pueden ser aislados de cerdos en el campo (Van Oirschot y Terpstra, 1989).

Existen "cepas" de campo del VFPC, que muestran en un amplio rango de patogenicidad, desde muy virulentas hasta casi avirulentas. Las "cepas" de alta virulencia producen la enfermedad aguda y virtualmente con 100% de mortalidad. Las "cepas" de moderada virulencia generalmente conducen a las presentaciones subagudas o crónicas y los cerdos subsecuentemente mueren o se recuperan. Los cerdos infectados posnatalmente con "cepas" de baja virulencia usualmente tienen enfermedad muy ligera o sin signos y desarrollan inmunidad. Las "cepas" pueden generar anomalías fetales. Existen "cepas" artificialmente atenuadas, usadas como vacunas, las cuales son avirulentas aún para los fetos. (Van Oirschot y Terpstra, 1989).

Los factores del hospedador parecen influenciar en el resultado de las infecciones con "cepas" del VFPC. Ha sido informado que la virulencia del VFPC puede ser una propiedad inestable; como ejemplo las "cepas" del VFPC parecen incrementar en virulencia mediante pasajes a través de los cerdos (Dunne 1975).

1.5. EPIZOOTIOLOGIA.

1.5.1. TRANSMISION

1.5.1.1. Vías

Bajo condiciones experimentales los cerdos han sido infectados por vía oral, nasal, aerogénica, conjuntival, genital y varias rutas parenterales (Dunne, 1964; Ressang, *et al.*, 1972; Liess, *et al.*, 1976). Los cerdos infectados pueden diseminar el virus durante el período de incubación. En caso de la infección con una "cepa" virulenta, se presentan altos títulos de virus en la sangre y en los tejidos; importantes cantidades son excretadas también en fluido oral y pequeñas cantidades en la orina, heces y el fluido nasal y lacrimal. La excreción viral continúa hasta, morir o en caso de sobrevivir se desarrollaran anticuerpos específicos. Por otro lado la infección postnatal con "cepas" de baja virulencia, se caracterizan por períodos de cortos de excreción y multiplicación viral, seguida de una respuesta. Como una consecuencia, las "cepas" virulentas del virus del VFPC, usualmente se distribuye más rápidamente en la piara e induce una alta morbilidad y mortalidad que las "cepas" de baja virulencia. Los cerdos infectados crónicamente distribuyen el virus continuamente o intermitentemente hasta morir (Mengeling y Packer, 1969).

Experimentalmente, el VFPC ha sido transmitido por diferentes vías: oral, nasal, conjuntival, genital y parenteral. Las vías oral y nasal son probablemente las más comunes en el campo. Los cerdos que han sido infectados con el virus VFPC pueden diseminar con el virus antes que los signos de la enfermedad que hayan sido mostrados. Durante la enfermedad es excretado en toda las excreciones, notablemente: saliva, orina y heces. Los cerdos que sobrevivan a una infección aguda o subaguda desarrollan anticuerpos y no diseminan al virus por largo tiempo. Por otro lado los cerdos infectados por una cepa de virulencia moderada pueden sufrir una infección crónica y excretar el virus continuamente o intermitentemente hasta morir (Mengeling y Cheville, 1968). El VFPC puede cruzar la barrera placentaria y cerdas preñadas que han sobrevivido a una infección, pueden después abortar o producir lechones momificados, nacidos muertos o débiles, con ascitis, edema, temblor y malformaciones (Young *et al*, 1955; Harding *et al*, 1966). La forma más incidiosa es la infección congénita causada por "cepas" de baja virulencia, los cuales pueden diseminar el virus continuamente por meses sin mostrar los signos de la enfermedad o desarrollar una respuesta inmune (Van Oirschot y Terpstra, 1977). Las infecciones crónicas y persistentes constituyen el mejor mecanismo de perpetuación del virus en epizootias causadas por "cepas" de baja virulencia.

No todas las "cepas" virales se distribuyen de igual fácil forma. Mientras los cerdos infectados con el VFPC se distribuye el virus en altas cantidades durante el periodo completo de la enfermedad, la infección posnatal con "cepas" de baja virulencia se caracteriza por periodos cortos de multiplicación viral y excreción, seguidos por una respuesta de anticuerpos. Como una consecuencia, generalmente del VFPC virulento se distribuirá rápidamente en una piara infectada e inducen una más alta morbilidad que las "cepas" de baja virulencia.

La distribución del virus entre premisas puede ocurrir por varios principios. Movimiento de cerdos, que están incubando la enfermedad o causando una infección persistente, lo cuál es la causa más común de un brote. La infección usualmente se origina en las granjas que tienen cerdos en crecimiento, pero puede ser también debida a contactos con excreciones virales de los cerdos o tráfico de cerdos contaminados, o en un medio ambiente contaminado durante el transporte. Movimiento de "cerdas portadoras" cargadas pueden causar una infección.

El VFPC puede sobrevivir en el cerdo o en sus subproductos. La sobrevivencia puede ser prolongada por meses y aún por años, cuando la carne es almacenada, congelada o refrigerada.

Los cerdos susceptibles pueden contraer la enfermedad, con desechos de la cocina o comida (escamochas) sin un tratamiento adecuado por calor. En esta forma el virus puede ser transmitido a través de distancias y causar brotes en áreas libres.

La transmisión mecánica por el hombre es de gran importancia, significativa en áreas con una densa población de cerdos. Granjeros, castradores y veterinarios pueden transmitir el virus por ropa, botas, instrumental y medicamentos contaminados, especialmente los de uso parenteral.

El VFPC puede ser transmitido mecánicamente por el artrópodo hematófago que comúnmente está presente en las granjas, como el piojo (*Haematopinus suis*) y varias especies, moscas, (*Stomoxys tábanos* y *Aedes*). La replicación de VFPC dentro de los artrópodos nunca ha sido demostrado. La diseminación del virus de las piaras infectadas a las susceptibles está limitada por la distancia; hay más diseminación mientras se encuentren en estrecha proximidad, junto con una alta densidad de vectores.

La transmisión del VFPC a través del aire exhalado en época de lluvia (Shope, 1958), es poco creíble que juegue un papel importante en la epizootiología. Pero el papel de transmisores que juegan los perros, gatos, roedores y pájaros, es cuestionable (Schgwarte, 1959).

Infecciones aerogénicas, pueden ocurrir a través de las puertas, jugando un papel importante en la distribución de granja a granja (Dunne, 1964). El VFPC puede circular en cerdos silvestres en algunos países puede ser un peligro para el cerdo doméstico.

1.5.1.2. Transmisión natural

La principal forma de transmisión es por contacto directo, entre cerdos infectados y los susceptibles, con excreciones y secreciones de animales enfermos. Esto ocurre al introducir en la granja cerdos enfermos o portadores y al transportar animales susceptibles en vehículos contaminados (Correa, 1981).

1.5.1.3. Portadoras del virus

Cuando las cerdas preñadas son expuestas a las "cepas" de baja y moderada virulencia, las infecciones iniciales no son frecuentemente notificadas, pero el virus puede ser transmitido a los fetos "in utero". Dependiendo de la virulencia de la "cepa" viral y del estado de gestación, las cerdas pueden tener abortos o fetos momificados, o nacidos muertos, o cerdos débiles. Debido a que el virus en los fetos y en la placenta, grandes cantidades del virus puede ser diseminados a través de distancias (Weenvoort y Terpstra, 1985).

La transmisión congénita se presenta cuando las cerdas gestantes son expuestas a "cepas" de VFPC de baja virulencia y transmitan el virus a los fetos. Weenvoort y Terpstra (1985), investigando úteros grávidos de marranas de piaras infectadas, encontraron que el llamado "síndrome de la marrana portadora", puede ocurrir hasta en un 43% de las marranas preñadas de una piara. Por causa de la persistencia del virus de FPC en los fetos y placentas se puede diseminar grandes cantidades del virus al parir. La transmisión da como resultado fetos momificados, mortinatos, malformaciones, animales prematuros, lechones débiles con temores, estos últimos podrán ser reservorios y diseminar el virus, ya que los lechones pueden estar liberando grandes cantidades de virus durante 4 a 6 meses, sin estar mostrando signos de la enfermedad o desarrollo de respuesta inmune.

1.5.1.4. Movilización de animales.

La distribución del virus de una piara a otra puede efectuarse por varios caminos. El movimiento de cerdos incubando la enfermedad o con infecciones persistentes, es el modo más común. La infección se origina directamente de las granjas infectadas. el contacto estrecho con cerdos que excretan virus, durante el mercadeo o durante el transporte, puede ocasionar una considerable diseminación viral. Algunas veces cuando se les pone a los animales inyecciones de sedantes, contribuyen a una mayor diseminación del virus. El movimiento de cerdas gestantes "portadoras" introducirá la infección en la piara.

1.5.1.5. Papel del cerdo y sus subproductos.

El VFPC es resistente en un medio ambiente rico en proteínas y puede sobrevivir en cerdos y sus subproductos a pesar de su procesamiento. La supervivencia del virus puede ser prolongada, por meses y hasta por años, cuando la carne es almacenada en refrigeración y congelación, respectivamente. En estas condiciones el virus puede ser transportado a través de grandes distancias y ser introducido en países y áreas libres de esta enfermedad. Los cerdos susceptibles pueden contraer la enfermedad cuando la granja está contaminada o por desechos de alimentos contaminados, aún tratados con calor. La basura que contenía desechos con virus fue la responsable del 18% de los brotes de VFPC en los USA en 1972; y por el 22% de casos en 1973, (Dunne, 1975).

La alimentación del cerdo con desperdicios de alimento y basura de restaurantes escamochas mal cocidas, puede generar que el virus permanezca viable por un tiempo (Terpstra, 1988), esto en México no se encuentra regulado como en otros países siendo un alto riesgo alto.

1.5.1.6. Transmisión mecánica por el hombre.

La transmisión mecánica del VFPC por el hombre es muy significativa en áreas con alta densidad de cerdos y de pjaras. Con respecto a esto, los granjeros, los castradores, inseminadores, vacunadores y veterinarios pueden transmitir el virus por contaminación de instrumentos, por ejemplo la aplicación de medicamentos, etc. El hombre fue el responsable del 40% de la diseminación del VFPC en Hessen (Alemania) en los años de 1971-1974. En la práctica común de la Medicina Veterinaria, es común encontrar que no se hace el cambio de agujas utilizando la misma con muchos animales; constituyendo un enorme riesgo con animales virémicos y después con animales susceptibles.

1.5.1.7. Transmisión por vectores (artrópodos).

Aunque en menor importancia este tipo de transmisión por artrópodos hematófagos puede contribuir dentro de ciertas circunstancias a la transmisión de la FPC. En 1919, Dorset, *et al*, describieron la transmisión de la FPC por moscas (*Musca domestica*) y por moscas estableras (*Stomoxys calcitrans*). El VFPC fué transmitido por la inoculación de una suspensión de moscas domesticas homogenizadas o por las picaduras de moscas estableras después de 24 horas de exposición. más recientemente, Miller *et al* (1974), aislaron el VFPC de moscas domésticas y de moscas estableras.

1.6. PATOGENIA Y MANIFESTACIONES CLINICAS

En condiciones naturales la vía de entrada del VFPC es bucal y nasal. Ocasionalmente el virus penetra por la mucosa de la conjuntiva, genital, o por raspaduras en la piel. El virus infecta y se replica inicialmente en las células epiteliales de las criptas tonsilares y se difunde posteriormente a los tejidos linfoides, multiplicándose en las células del tejido endotelial. A partir de las tonsila, el VFPC es transferido, vía vasos linfáticos, a los ganglios linfáticos: el virus se replica y pasa a sangre periférica, de ahí al bazo y a los ganglios viscerales llegando al intestino delgado. Como resultado de la diseminación en tejidos linfoides y en la circulación, el nivel de viremia es alto, ocasionando leucopenia y trombocitopenia; manifestándose una inmunosupresión, lo que hace al animal más susceptible a infecciones secundarias. El virus no invade órganos parenquimatosos, sino hasta después de la fase de viremia; a las 48 horas postinfección llega a la médula ósea, timo, bazo, hígado y ganglios linfáticos. La causa principal de la muerte no se conoce, se considera que el animal muere al ocurrir una trombocitopenia marcada, liberación masiva de sustancias vasoactivas y el consecuente choque.

En infecciones intrauterinas las "cepas" de baja virulencia de VFPC atraviesan la placenta llegando a los fetos, los cuales después de la mitad de la gestación, desarrollan anticuerpos específicos que no son maternos; generalmente el daño fetal es alto. Los animales que llegan a nacer pueden presentar un estado de tolerancia inmunológica; en la cual el virus es capaz de multiplicarse por periodos largos sin que se desarrollen anticuerpos ni ocurra una respuesta inmune protectora, de esta manera se convierten en portadores sanos. Los lechones tienen toda la vida niveles altos de viremia, la cual puede ser transitoria después de la ingestión de anticuerpos calostrales.

1.6.1. Infección aguda

En la FPC la distribución del virus a través del hospedador es caracterizada por una fase linfática, una viremia y una fase visceral.

La tonsila es el órgano blanco primario para la multiplicación viral. Después de iniciada la replicación, el virus es transferido, probablemente por la vía de los vasos linfáticos o por los nódulos linfáticos, drenando la región tonsilar. Los virus entonces alcanzan los capilares de sangre eferente, dando un importante incremento en la viremia inicial y el virus es atrapado en el bazo.

El órgano blanco secundario es el tejido que produce grandes cantidades de virus, resultando títulos de infectividad en la sangre periférica. Subsecuentemente el VFPC se replica en otros tejidos del sistema inmune, como son nódulos linfáticos viscerales y en las estructuras linfoides del tracto digestivo y de la médula ósea. Esto sucede presumiblemente después de la fase virémica, que es cuando los virus invaden los órganos parenquimatosos. Generalmente, los títulos del VFPC en el tejido linfoide son más altos que en órganos parenquimatosos (Ressang, 1973a).

El VFPC tiene predilección por las células reticulares, endoteliales y epiteliales. Los virus inicialmente infectan las células epiteliales de las criptas tonsilares y después se distribuyen dentro del tejido linforeticular. Después de una fase de crecimiento, lo cual ocurre particularmente en los nódulos linfáticos, la infección de las células de los órganos epiteliales es presumiblemente mediada por células del sistema del retículo-endotelial. El tiempo en el cual se distribuye el virus depende principalmente de la virulencia del virus. "cepas" de alta virulencia puede ser detectadas en la mayoría de los órganos de 5-6 días del periodo de infección (Ressang, 1973a).

La FPC aguda desarrolla severa trombocitopenia y desórdenes de la síntesis del fibrinógeno. Estos desórdenes en conjunción con la degeneración de las células endoteliales, causan múltiples hemorragias en los estados terminales de la FPC. La mortalidad en las infecciones agudas alcanzan hasta el 100%. El mecanismo por el cual es realmente responsable de la muerte no es bien conocido, pero los severos desórdenes de circulación parecen ser un factor determinante (Fuchs, 1968).

Al tercer día de la enfermedad la temperatura es de 40 C, luego sube a 41 ó 42 y después la temperatura llega a ser subnormal y durante estos periodos hay inactividad del animal y se presenta anorexia. Hay leucopenia, las cuentas normales varían de 10 a 40,000 glóbulos blancos por mm (con un promedio de 21,000), pero en la FPC bajan hasta llegar a los 9,000 o incluso a 3,000 (entre el 4o y 7o días). Hay que tomar en cuenta que los cerdos sanos menores de 5 semanas, normalmente tienen una cuenta leucocitaria baja (Correa, 1981). Al principio de la enfermedad hay baja de glóbulos blancos. Pero pocos días después, cuando al animal le bajan sus defensas y tiene muchas hemorragias internas habrá invasión de bacterias al interior del organismo. Por lo que el número de leucocitos aumenta. También puede haber trombocitopenia, inicialmente baja el número de leucocitos al mismo tiempo baja la cantidad de plaquetas y después éstos empiezan a aumentar. Este es otro dato con el que se puede llegar al diagnóstico, sobre todo en aquellos lugares en donde no hay cerca un laboratorio que pueda trabajar con Inmunofluorescencia. El número normal de trombocitos varía de 200,000 a 500,000 y en la FPC baja a de 50,000 ó a 20,000, es decir, al 10%. (Correa, 1981).

Hay conjuntivitis, descarga nasal, disnea, constipación en algunos y diarrea en otros, vómito (sobre todo en la primera fase de la enfermedad); el amontonamiento es una observación que los clínicos toman mucho en cuenta sobre todo para diferenciar con erisipela, ya que en erisipela no hay amontonamiento. Varios días después de que sube la temperatura a 40 ó 41C, habrá hipotermia (cuando ya el animal está muy mal) y la temperatura le baja a 37 ó 38 C (Correa, 1981). Hay incoordinación del tren posterior, los animales caminan ladeados y arrastran los pies; hay hiperemia en la piel, que después estará congestionada y finalmente cianótica. Estos grados dependen del avance de la enfermedad; después los animales ya no se pueden levantar y al final pueden mostrar convulsiones (movimientos de natación). Puede haber también melena. Los casos crónicos pueden presentar áreas de decoloración en la piel de las orejas, alopecia y retraso de crecimiento (Correa, 1981).

Se han observado clínicamente casos atípicos de FPC producidos por "cepas" de campo, de baja virulencia o de origen vacunal. Que pueden ocasionar la presentación del temblor congénito (o mioclonia congénita), al nacimiento de los lechones o pocas horas después, con temblores de la cabeza, cuello, espalda y miembros posteriores, debilidad, pocos deseos de mamar y pérdida del equilibrio. Cuando este problema se asocia a la utilización de vacunas de virus vivo modificado, aplicadas a los 20-97 días de gestación habrá micrognatia, ascitis y deformidades (Correa, 1981).

Los recién nacidos procedentes de madres no vacunadas pueden morir de FPC aguda sin que se presenten signos en las cerdas. Esto se ha visto a consecuencia de la infección por "cepas" de campo de baja virulencia que no enferman a las madres, pero sí a los lechones procedentes de hembras no vacunadas. También pueden enfermar al ponerlos en contacto con cerdos sanos inmunizados con vacunas de virus vivo poco modificado. En los casos sobreagudos generalmente no se observan lesiones: en los casos agudos y subagudos habrá lesiones de tipo septicémico, por lo que hay que hacer el diagnóstico diferencial con cualquier enfermedad septicémica, como la erisipela, pasteurelosis y sobre todo Salmonelosis septicémica. En los casos agudos y subagudos de FPC habrá petequias y hemorragias equimóticas en muchos órganos y tejidos, porque hay circulación sanguínea lenta y porque hay degeneración hidrópica de las células endoteliales (que recubren la cara interna de los vasos sanguíneos), lo que ocasiona rupturas de los vasos y extravasación, lo que da lugar a que se formen las equinosis y los infartos (Correa, 1981).

Se presentan hemorragias en riñones, ganglios y en las serosas y congestión en la piel (sobretudo en las regiones crurales internas y en la abdominal). En los ganglios linfáticos habrá edema, aumento de volumen, congestión, petequias y hemorragias. Las tonsilas presentan inflamación y después necrosis, ulceraciones y abscesos causados por los infartos e invasiones bacterianas secundarias. El pulmón muestra congestión, infarto, hemorragias, bronconeumonía, pleuritis y atelectasia. El corazón presenta congestión del miocardio, infartos y a consecuencia de las infecciones secundarias, hidropericarditis y hemorragias. Al abrir las costillas longitudinalmente a la altura de la unión con el esternón, se observa que la línea blanca está calcificada. Esta lesión se presenta principalmente en los casos crónicos y es más notable entre la sexta y octava costilla, aunque en todas las demás también se puede presentar. En el bazo hay infartos subcapsulares que son casi patognomicos, se presenta principalmente en los bordes y a veces dentro del parénquima. Al vacunar a los cerdos con vacunas lapinizadas (de bajo pasaje) muy poco atenuadas y sin combinarlas con suero hiperinmune (o al aplicarlas con sueros inefectivos) se observa que el 20% 40% de los animales mueren a causa del virus vacunal, en estos cerdos muertos a causa de vacunas lapinizadas poco atenuadas, en el bazo se presentan pequeños infartos subcapsulares. En la vesícula biliar sólo en muy raras veces hay edema en la serosa (en el caso de la peste porcina africana, en la vesícula biliar muy frecuentemente hay edema muy marcado). La bilis está muy espesa, tiene un tinte hemorrágico y hemorragias en la mucosa. Hay infartos, hemorragias y

necrosis en el pulmón, riñón e hígado, y raras veces en el prepucio y en la lengua. En el riñón se presentan petequias, equimosis y hemorragias subcapsulares, en el parénquima y en la pelvicilla renal. Esta lesión no es patognomónica. Los animales que duran muchos días enfermos son los que presentan más claramente estas lesiones (huevo de pipila). En los casos agudos se pueden observar 2 ó 3 petequias en cada riñón, en el área subcapsular, las cuales pueden ser difíciles de localizar. La vejiga urinaria puede estar vacía, mostrando áreas de congestión, hemorragias y petequias y con contenido sanguinolento y espeso; raras veces con coágulos (Correa, 1981).

El estómago también puede estar vacío, porque el animal ha dejado de comer por varios días; hay congestión y hemorragias en la mucosa, sobre todo en el área fúndica. Sin embargo, en los cerdos es muy frecuente encontrar hemorragias en el estómago a consecuencia de otros padecimientos. En la primera parte del colon y en la válvula ileocecal, se presentan úlceras botonosas, la cuales en la válvula ileocecal no están tan claras como en la primera parte del colon, el virus de la FPC predispone el desarrollo de enteritis necrótica generalizada, ocasionada por infecciones bacterianas. Las úlceras están cubiertas de exudado fibrinoso. En el intestino grueso también puede haber úlceras botonosas y cuando están en la primera parte es casi patognomónico. (Correa, 1981).

El encéfalo es un órgano sumamente importante para el diagnóstico, en los casos sospechosos se recomienda colectarlo y remitir un hemisferio en formol (QP) al 10%, para hacer histopatología, y el otro hemisferio hay que enviarlo congelado en hielo seco, o por lo menos refrigerado y en glicerina, para intentar aislar el virus a partir de él. En el encéfalo va a haber lesiones de encefalitis, mielitis, infiltración vascular y perivascular, inflamación endotelial e infiltración mononuclear, hemorragias microscópicas perivasculares y áreas de hialinización. En el corazón hay varias áreas de inflamación, disociación del sarcoplasma perinuclear y a veces hay cuerpos de inclusión intranucleares, según algunos autores; en los ganglios linfáticos estos cuerpos de inclusión aparecen entre el 6° y 12° días de la infección. En las áreas calcificadas de las epífisis de las costillas hay aumento del área de las células maduras cartilaginosas, entre la zona de multiplicación de células cartilaginosas y la zona ósea trabecular, esto es especialmente notorio en los casos crónicos. En las glándulas adrenales hay hipertrofia de la corteza, ampliación de la zona fasciculada y atrofia de las zonas restantes. Las lesiones del endotelio vascular son más importantes, ya que el virus ataca a los endotelios vasculares, ó sean las envolturas internas de los vasos sanguíneos. Los capilares endoteliales presentan degeneración hidrópica, necrosis, hemorragias, marginación de leucocitos e infartos (Correa, 1981).

Los signos de la infección aguda aparecen después del período de incubación de 2 a 6 días. Los signos primarios son fiebre, pérdida del equilibrio, movimientos lentos, y un apetito reducido; ellos se agravan en los días siguientes. Los picos de temperatura son cercanos a los 42 C. Relativamente a principios de la enfermedad los cerdos desarrollan principalmente conjuntivitis con una descarga ocular marcada. En algunos casos la descarga de moco nasal purulento es evidente. Los signos del tracto digestivo incluyen constipación, seguida por diarrea y algunos con recurrencia de constipación; algunos cerdos vomitan un fluido amarillento conteniendo bilis. Los cerdos afectados tiemblan y se apilan unos con otros. Ocasionalmente pueden presentarse convulsiones. Durante los estados terminales de la enfermedad, la mayoría de los cerdos tienen un mal estado de carne, muestran paso titubeante, seguido posteriormente de parálisis posterior (Correa, 1981). Una decoloración y un color púrpura (cianosis) extendido a través del abdomen, morro y orejas, pueden también presentarse en los lados mediales de las piernas. El grado de mortalidad de la FPC aguda es de 95 al 100%. Muchos cerdos mueren entre los 10-20 días del período de incubación. Dunne (1975) distinguió entre la FPC aguda de la subaguda. Algunos cerdos infectados desarrollan signos similares, pero menos severos de la enfermedad y después de un período prolongado de incubación, sucumben a los 30 días post-infección.

1.6.2. Infección persistente

El virus persiste por un largo período, algunas veces durante la vida entera del hospedador. Los casos en los cuales persiste son generalmente causadas por los virus de baja y moderada virulencia. Las formas diferentes de la FPC persistente pueden corresponder a la forma.

En la FPC crónica, Mengeling and Parker (1969), distinguen 3 fases clínicas: La enfermedad aguda; el mejoramiento clínico y la exacerbación de la enfermedad aguda. La fase aguda es esencialmente de la misma en la FPC aguda, pero los virus pueden diseminarse más lentamente, pero las concentraciones en suero y órganos tiende a ser bajo. En el período secundario, el título del virus en el suero es más bajo o ausente. El antígeno viral tiende a estar limitado a las células epiteliales de las tonsilas, ileum, glándulas salivales y riñón. El desaparecimiento temporal del virus del suero es el resultado probable de la formación de anticuerpos específicos, y/o de un decremento en el número de células que están liberando virus.

La ocurrencia simultánea del virus y anticuerpos puede resultar en la deposición de los complejos antígeno-anticuerpos en el riñón, un proceso que eventualmente se convierte en la glomerulonefritis (Cheville *et al.*, 1970).

Durante la tercera fase el virus también se dispersa por todo el cuerpo. Esto puede ser promovido por el agotamiento inmune que parece desarrollar los cerdos infectados crónicamente. Los cuales serán más susceptibles a las infecciones secundarias bacterianas (Mengeling and Packer, 1969).

El brote tardío de la FPC se caracteriza clínicamente por un período largo inicial de ausencia virtual de signos clínicos. Estas infecciones usualmente siguen a la exposición al VFPC de virulencia reducida en el período fetal (Van Oirschot and Terpstra, 1977). Los cerdos mostrarán una viremia de vida larga, con altos títulos, los cuales pueden ser temporalmente suprimido después de la ingestión de anticuerpos colostrales. El antígeno del VFPC es distribuido a través del tejido epitelial, linfoide y retículo-endotelial. Los cerdos infectados persistentemente no producen anticuerpos neutralizantes y contra el VFPC, este es el camino para contribuir a la persistencia viral. Los factores que provocan la aparición de signos clínicos después de un período largo de incubación son desconocidos. Cuando los cerdos sobreviven a un período largo de incubación mayor de 30 días, la infección puede ser meramente terminada (Dunne, 1975). La persistencia de la FPC da lugar a varias formas clínicas de FPC. Los cerdos que resultan infectados en la fase inicial pueden desarrollar la FPC crónica, durante la cuál su apariencia general es rara, de cerdos saludables (Mengeling and Cheville, 1968). En la cual la enfermedad es llamada "brote tardío", los cerdos infectados permanecen aparentemente sanos por un período largo, después del cuál desarrollan signos clínicos (Van Oirschot and Terpstra, 1977). El síndrome posterior es usualmente asociado con infecciones congénitas. Formas intermedias de FPC persistente pueden ocurrir (Carbrey *et al.*, 1977).

El FPC crónica se caracteriza por una enfermedad con períodos intermitentes y prolongados, con anorexia, fiebre, diarrea y alopecia, seguida por dermatitis como uno de los signos significativos. La FPC crónica puede ocasionar la presentación de de cerdos rojojos, estos pueden tener cabeza grande y tronco pequeño (debido al severo retardo de crecimiento) y lesiones en la pie; estos rojojos frecuentemente se paran con la espalda arqueada y las piernas y el trasero posterior bajo el cuerpo (Correa, 1981).

Mengeling and Packer (1969), dividieron la FPC crónica en tres fases. una reacción aguda primaria, con anorexia, depresión y fiebre; un período de mejoramiento clínico genera; recaída y muerte.

En el estado terminal, los cerdos pueden estar anoréxicos, depresivos y febriles. Los cerdos con FPC crónica pueden sobrevivir por algunos meses, pero todos eventualmente mueren.

Los brotes tardíos se caracterizan por un período inicial, durante el cuál los cerdos se infectan y virtualmente permanecen libres de la enfermedad (Van Oirschot and Terpstra, 1977). Los signos comienzan a desarrollarse a los pocos meses después de la exposición y consisten en de anorexia moderada y depresión, conjuntivitis, dermatitis y diarrea; con disturbios del equilibrio y locomotores, con parálisis del tren posterior. La temperatura corporal puede ser normal o elevada; la leucopenia es un signo consistente de FPC persistente, pero durante la enfermedad se puede desarrollar la leucocitosis.

Las "cepas" de FPC de reducida virulencia frecuentemente conducen a una enfermedad moderada, después los cerdos se recuperan. Los signos clínicos: pérdida de apetito, de equilibrio, diarrea y fiebre, son usualmente acompañados de leucopenia. Además de los signos de los casos aparentes frecuentemente ocurren infecciones subclínicas.

1.6.3. Infección Congénita

Cuando una cerda preñada es susceptible al VFPC, los fetos se pueden infectar por la vía transplacentaria. ELVFPC cruza la placenta, y puede subsecuentemente distribuirse de feto a feto. El antígeno del VFPC es usualmente distribuido a través del tejido fetal. El resultado de la infección fetal está determinada por el desarrollo (edad del feto) en el momento de la infección y por la virulencia del virus infectante. Las "cepas" de baja y mediana virulencia del VFPC están involucradas en las infecciones congénitas. Van Oirschot *et al.* (1981, 1983), describen el hecho de que en la FPC aguda la sangre periférica y linfocitos del bazo no respondieron consistentemente a mitógenos de las células T y B, mientras que los nodulos linfáticos tienen una alta capacidad de respuesta. Los cerdos infectados subclínicamente pierden su capacidad de responder con mitógenos de sangre periférica y linfocitos del bazo, a las células B.

Los linfocitos de sangre periférica de los cerdos persistentemente infectados con FPC tiene un decremento normal o ligero a los mitógenos (Van Oirschot, 1980).

Cuando un contacto primario con el FPC no es seguido por una respuesta normal de anticuerpos, puede resultar un tipo de hiperreactividad caracterizada por un período corto de incubación y una enfermedad más severa que en los cerdos infectados primariamente. En contraste con el fenómeno de sensibilización se ha descrito un aumento de la resistencia a la virulencia de FPC. Los cerdos infectados persistentemente con el VFPC de virulencia reducida, tienen una marcada sobrevivencia prolongada ante inoculaciones con "cepas" virulentas de FPC, conservadoramente ambos fenómenos ocurren en el campo.

Los mecanismos exactos de la patogénesis de la FPC no han sido bien entendidos. Korn y Matthaeus (1977,) opinan que la FPC es una enfermedad causada por desórdenes de un sistema enzimático, principalmente de la producción de la quimiotripsina. Otras teorías son descritas en forma extensiva revisadas por Fuchs (1968) y Mahnel y Mayr (1974).

Después de un período corto de infección con el VFPC, las secreciones oronasal y lacrimal contienen virus. La orina y las heces pueden ser virus-positivos, cuando el riñón y el tracto digestivo está infectados. El VFPC es excretado en altos títulos en las secreciones oronasales más que de orina y heces. Los virus también pueden diseminarse por la piel.

Una infección del VFPC congénita puede dar como resultado el aborto, momificación fetal, nacidos muertos, o nacimientos de lechones débiles y con temblor, muertes neonatales, nacidos aparentemente sanos con una infección persistente y los cerdos normales con anticuerpos contra la FPC. Pueden presentarse malformaciones de los órganos viscerales y del sistema nervioso central de los fetos. Muchos cerdos infectados "in utero" y nacidos vivos, mueren en un período corto, después de nacer, hemorragias de la piel son comunes en estos los cerdos.

1.7. DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

La variabilidad de los signos clínicos y las lesiones postmortem en los casos de FPC, raramente proveen una base para un diagnóstico inequívoco. Además la Peste Porcina Africana, pasteurelisis, Erisipela y la Salmonelosis pueden ser confundidas con una infección aguda de FPC. Por estas razones, el diagnóstico tentativo de campo debe ser confirmados mediante pruebas específica de laboratorio, para la detección del virus o de antígenos específicos.

Las pruebas de laboratorio más usadas son: la determinación de leucopenia y de trombocitopenia. La prueba de anticuerpos fluorescentes es probablemente la más valiosa, siempre y cuando se tome en cuenta la historia clínica, los signos y las lesiones del animal. La más utilizada es la prueba de fluorescencia directa haciendo cortes de tejidos congelados, principalmente se recomienda hacer secciones de amígdalas, aunque también se pueden hacer cortes de los ganglios; lo ideal sería congelar de inmediato estas muestras y transportarlas en hielo seco o en nitrógeno líquido al laboratorio. Un caso positivo a fluorescencia debe ser claramente positivo. También se puede tomar un fragmento de amígdala, bazo y ganglio, se prepara un macerado, se inoculan células PK15 y se tiñen con un conjugado más o menos a las 16 ó 24, ó más horas postinoculación, y se ve si son positivas, utilizando un microscopio de fluorescencia (Correa, 1981).

Si hay datos inexactos o incompletos en la historia clínica, está será poco valiosa. Contando con datos exactos sabremos si hay probabilidades de que se trate de FPC o de otra enfermedad. El diagnóstico de laboratorio sólo nos ayuda a corroborar los datos de la historia clínica. Una buena historia clínica explicará las irregularidades que se llegaron a observar en alguna prueba diagnóstica. Por ejemplo, si al hacer una prueba de laboratorio se obtiene un resultado positivo a la FPC por fluorescencia, para poder definir si esto se debe a un brote por virus patógeno, como primer paso, se deberá analizar la historia clínica. En los EUA se ha utilizando una prueba de suero neutralización basada en la inhibición de la fluorescencia. Esta prueba ha resultado muy útil en aquellas áreas ó países, en donde ya no se vacuna contra la FPC, de modo que los animales positivos, corresponderán a aquellos previamente infectados con virus de campo (Correa, 1981).

1.7.1. DIAGNOSTICO DIFERENCIAL E INTEGRAL.

La FPC presenta diversas manifestaciones clínicas, originadas por el grado de virulencia de la "cepa" infectante, confundiendo con enfermedades de variada etiología. Para obtener un diagnóstico preciso es necesario considerar los siguientes aspectos que nos ayudarán a controlar en forma eficaz e inmediata la enfermedad: 1.-Historia Clínica; 2.-Signos clínicos y lesiones observadas en la necropsia; 3.-Programas de vacunación; 4.-Tipos de vacuna utilizada (emplear vacunas autorizadas por la SAGAR; 5.-Alimentación con desperdicios de restaurantes o restos de comida casera no cocinadas; 6.-Introducción de los cerdos o compra de sementales; 7.-Granjas vecinas en las que se presentan la enfermedad; 8.-Visita de personas o vehículos ajenos a la granja; 9.-Uso de antibióticos sin éxito (Ramírez y Reynosa, 1993).

El diagnóstico diferencial de FPC debe realizarse en los síndromes siguientes: A.- Síndrome clásico Septicémico/Entérico/Encefalítico; B.-Síndrome Encefalítico en Adultos; C.- Síndrome Mioclónico en Lechones; D.-Síndrome Encefalítico en Recién Nacidos; E.-Síndrome de Lechones Débiles al Nacimiento; F.-Síndrome Abortos; G.-Síndrome de Fetos Momificados.

1.7.2. Demostración del virus o de antígenos virales.

La prueba de inmunodifusión doble en agar (AGDT), usando pancreas, hígado o nódulos linfoides mesentéricos fue ampliamente usada para la detección del antígeno en el principio de los años 60's. Pero la falta de sensibilidad y especificidad dejó mucho que desear, la AGDT fue remplazada en todos los laboratorios por la prueba de inmunofluorescencia directa (DIFT) sobre secciones congeladas de tejidos de los cerdos enfermos o muertos. Las muestras para este diagnóstico incluyen, tonsilas, hígado, riñon y la parte distal del ileon, éstas preferiblemente deben ser refrigeradas en el laboratorio, si es que se van a trabajar de inmediato. El envío de las muestras de animales nunca deben ser congeladas, nunca debe usarse conservadores porque pueden dar interferencia para el diagnóstico. Las secciones del tejido hechas con el criostato se tiñen con un conjugado anti-FPC y se examina con un microscopio de luz ultravioleta (de inmunofluorescencia). Las tonsilas son el tejido más importante para el diagnóstico; estudios de patogénesis revelan que la tonsila fue el primer órgano en ser positivo, después de una exposición oral de 48 hrs (Ressang, 1973a). En orden decreciente el porcentaje de reactores positivos a: tonsila, ileon, hígado y riñón, muestran fluorescencia en 98,71, 60 y 39% de animales positivos respectivamente (Terpstra,

1976). En casos de enfermedades crónicas y subagudas, la parte distal del ileon es frecuentemente encontrada como positiva y en algunas ocasiones es la única muestra que presenta inmunofluorescencia. La DIFT es una técnica disponible y rápida para la demostración de antígenos virales. fué una prueba aceptada oficialmente en programas nacionales e internacionales para la erradicación de la FPC en los EUA y en algunos países de la Comunidad Económica Europea. Sin embargo un resultado negativo, no excluye al virus de la FPC, por lo que se deben muestrear a los demás animales sospechosos.

La DIFT no diferencian a los antígenos de diferentes pestivirus; y hay resultados falsos positivos ante una infección por Diarrea Viral Bovina (DVB). Los cerdos vacunados con "cepas" vacunales de virus vivo modificado pueden dar una DIFT positiva a las 2 semanas después de la de vacunación. (Ogawa *et al.*, 1973; Terpstra, 1978). La inoculación de conejos es usada para diferenciar entre "cepas" lapinizadas y "cepas" de campo del VFPC. En contraste, con las "cepas" de campo, las "cepas" lapinizadas causan una reacción febril y una respuesta de anticuerpos en los conejos inoculadas por vía intravenosa.

El aislamiento del virus en cultivos celulares es el método mas sensible para el diagnóstico de la FPC y esto puede revelar la presencia de pequeñas cantidades de virus. Para este propósito las células de PK-15 son ampliamente usadas. Los cultivos son teñidos con un conjugado inmunofluorescente y con examinados para detectar focos fluorescentes después de 24 a 72 hrs posinoculación. La técnica de exaltación del efecto citopático del virus de la Enfermedad de Newcastle (END), es usada en Japón como técnica de rutina (Kumagai *et al.*, 1961). La prueba está basada en el aumento del efecto citopático del virus de la Enfermedad de Newcastle en células de testículo de cerdo en las cuales el virus de ha sido replicado. La END e muy laboriosa y se emplea mucho más tiempo que con la DIFT y es menos conveniente para la detección de "cepas" de virus de baja virulencia.

1.7.3. DETECCION DE ANTICUERPOS

1.7.3.1. Reacción Inmune

Los cerdos que se recuperan de la enfermedad, poseen anticuerpos contra la FPC. En comparación con otras infecciones virales, los anticuerpos aparecen tardíamente en la circulación, demostrándose por las técnicas de neutralización, inmunofluorescencia indirecta, inmunodifusión, fijación del complemento, hemaglutinación pasiva; de estas pruebas, la prueba de neutralización es la más específica; ésta puede diferenciar entre anticuerpos de la FPC y los del DVB. Sin embargo, los bajos títulos de anticuerpos neutralizantes para la FPC, pueden aumentar después de una infección con DVB. La prueba de neutralización es una prueba muy laboriosa, por lo que en los últimos años se desarrolló una prueba nueva que ha tenido un impacto importante; la cual es la prueba de neutralización-peroxidada (Holm Jensen 1981; Terpstra *et al.*, 1984), la cual ahorra tiempo y puede ser aplicada en amplia escala.

También pueden ser producidos anticuerpos neutralizantes durante un curso agudo o fatal subagudo de la FPC (Matthaeus and Korn, 1966; Mengeling, 1970). Los cerdos con la FPC crónica, los cuales eventualmente mueren, ellos también son capaces de montar una respuesta de anticuerpos específica, resultando una aparición simultánea de virus y anticuerpos en la sangre (Mengeling and Parker, 1969). Fetos porcinos ganan inmunocompetencia alrededor de la mitad de gestación. Sin embargo los anticuerpos neutralizantes específicos contra la FPC son formados únicamente en la fase terminal del desarrollo fetal (Trautwein *et al.*, 1977).

Los cerdos con La FPC congénita persistente, raramente producen anticuerpos específicos. Cada cerdo tiene una respuesta inmune normal hacia antígenos relacionados de la FPC (Van Oirschoot, 1977), y los casos de insensibilidad pueden ser explicados por tolerancia inmunológica específica a la FPC.

Ocasionalmente los cerdos infectados postnatalmente con La FPC, no muestran una respuesta de anticuerpos normales. Los anticuerpos neutralizantes pueden ser detectados temporalmente (Van Oirschoot, 1977) o estar ausentes (Korn, 1964; Carbrey *et al.*, 1977). Los cerdos infectados y sin anticuerpos neutralizantes pueden poseer anticuerpos detectables por otras pruebas (Corthier *et al.*, 1977; Van Oirschoot, 1977). Una respuesta de anticuerpos anormales puede ser consecuencia de una pobre inmunogenicidad de las "cepas" de la FPC. Las "cepas" inmunogénicamente pobres, son usualmente de reducida virulencia. Los cerdos que producen una respuesta de anticuerpos normales hacia la FPC se encuentran inmunes a una infección subsecuente.

Las cerdas seropositivas transmiten anticuerpos por la vía del calostro a sus crías. Por lo tanto los enterocitos inmaduros del intestino de los cerdos recién nacidos son permeables para las inmunoglobulinas en las primeras 36-48 hrs de vida y los anticuerpos contra la FPC pueden entrar directamente a la circulación sanguínea. Los anticuerpos de origen materno tienen una vida media de aproximadamente de 14 días. La inmunidad pasiva generalmente protege a los cerdos de la muerte durante las primeras 5 semanas de vida, pero no protege contra la replicación viral (Terpstra, 1977).

El significado de la inmunidad celular en la FPC no es conocido. Corthier (1978) and Remond *et al.*, (1981) detectaron una respuesta blastogénica transitoria de linfocitos periféricos de sangre hacia los antígenos de la FPC en los cerdos infectados y vacunados (Van Oirschot *et al.*, 1983).

La detección de anticuerpos específicos contra el VFPC es usada para demostrar la infección con "cepas" de baja virulencia. Como la respuesta de anticuerpos toma de 2 a 3 semanas para desarrollarse las muestras sanguíneas deben ser colectadas después de 3 semanas de haber estado en contacto con animales sospechos. Las inspecciones serológicas pueden también ser útiles en la fase terminal de erradicación, para detectar infecciones en cerdas con crianza (Liess *et al.*, 1976); varias técnicas ha sido descritas para este propósito. Las técnicas AGDT, DIFT, la técnica modificada de Fijación del Complemento, la Hemaglutinación Pasiva y la Inmunolectroforesis, no diferencian entre anticuerpos contra el VFPC y el VDVB; los resultados positivos tienen que ser confirmados por la técnica de Neutralización Viral (VN).

La incidencia de las infecciones de DVB en cerdas con crianza en el oeste de Europa se ha encontrado mediante la VN que fueron positivos más del 10 al 40%, esta técnica fue aprobado como el único método serológico válido en el programa de control y erradicación la FPC.

La prueba de neutralización fue desarrollada en cultivos celulares usando una cantidad constante de virus, contra diluciones variadas del suero. Debido a que este virus no causa efecto citopático el virus no neutralizado se detectará únicamente hasta después de su multiplicación, mediante la prueba de Inmunofluorescencia (Ressang and Van Bekkum, 1972; Liess *et al.*, 1976), el método de END (Komaniwa *et al.*, 1981); o por el ensayo de inmunoperoxidasa (Terpstra *et al.*, 1984). Ocasionalmente, el suero de los cerdos infectados con DVB puede reaccionar en diluciones bajas de la prueba de VN con el antígeno La FPC (Liess *et al.*, 1977).

El grado de reacción cruzada depende de la cepa infectante de DVB, el intervalo entre la exposición y el muestreo, así como la cepa de FPC usada para realizar la prueba de neutralización (Liess *et al.*, 1977). Los altos niveles de anticuerpos aumentan después de la exposición a "cepas" de baja virulencia de La FPC, permitiendo un aumento relativo de anticuerpos contra la FPC, por la prueba VN (Terpstra *et al.*, 1984).

1.8. PROFILAXIS Y CONTROL

En los países libres de La FPC, existen medidas estrictas para prevenir la introducción del virus. La importación de los cerdos, el insuficiente cocimiento de la carne de puercos en productos y subproductos provenientes de países infectados con la FPC, deben ser prohibidos. Sumado a esto, los desechos de las cocinas de los aviones, barcos y trenes internacionales deben ser totalmente destruidos, como una medida general de precaución contra las enfermedades exóticas del ganado.

Cuando no se toman en cuenta las medidas anteriores y la enfermedad ya ha sido introducida, los policia veterinarios y medidas sanitarias, deben ponerse en acción y la llave del éxito dependerá de poder aclarar rápidamente la fuente de infección, para así poder eliminar a este virus. Dependiendo de la situación local, las medidas tomadas pueden incluir una prohibición del movimiento de los cerdos aumentando la vigilancia en las granjas afectadas y destruyendo todos los los cerdos que se encuentren sospechosos de la enfermedad (medida que ha sido aplicada en algunos países), para evitar otro brote. La construcción de las granjas debe ser hecha de modo que puedan ser mantenidas limpias, no se debe permitir la entrada de ningún animal sospechoso, y se deben eliminar los cerdos sospechosos; antes de repoblar la granja es preferible utilizar cerdos centinelas, para asegurarse así de que ya que está libre de la enfermedad, necesitando una supervisión estricta.

La FPC ha sido erradicada en los países Escandinavos, Irlanda, El Reino Unido, Suiza, Australia, Canadá y de los EUA por eliminación total de los animales afectados, apoyado por medidas zoonitarias. Sin embargo en muchos países, la enfermedad se ha mantenido en su posición. teniendo que forzar la medidas de control.

En un granja con producción intensiva, el movimiento a grandes distancias resulta un alto riesgo para adquirir esta enfermedad dentro de una área con alta densidad de cerdos por la alta diseminación del virus. El síndrome de la cerda portadora, la aparición de "cepas" de baja

virulencia responsables de infecciones persistentes, inaparentes, y atípicas, han impedido el progreso hacia la erradicación final de esta enfermedad. Como resultado de estos manejos y factores epizootiológicos, los brotes frecuentemente son diagnosticados tardíamente, después de que el virus se ha distribuido ampliamente (Ramírez y Reynoso, 1993).

Para romper con la perpetuación incontrolable del virus, la vacunación ha sido usada en gran escala, la cual ha ayudado para eliminar la enfermedad, o para reducir el número de brotes, a un nivel que puede ser erradicado por medidas sanitarias (Van Bekkum, 1976).

La medida más antigua es la llamada el método de la vacunación simultánea, donde el suero hiperinmune-FPC y virus virulento, son inoculados en diferentes sitios. El método ha sido prohibido o abandonado en muchos países; el uso del virus virulento contribuyó a la distribución mundial de la FPC. Las vacunas inactivadas con cristal violeta tienen una aplicación estrecha; esta vacuna, aunque segura, sólo proveía de protección reducida si se administraba dos veces, seguida de un refuerzo cada 6 a 12 meses (Van Bekkum, 1966); sin embargo, esta no protegió contra la multiplicación del virus y su distribución (Ressang *et al*, 1972) y el virus virulento puede ser recuperado regularmente de los fetos, cuando las cerdas vacunadas han sido desafiadas (Huck y Aston, 1964).

Las vacunas de virus vivo modificado (VLM) éstas ahora son preferibles por su mayor potencia. Algunas de las primeras vacunas de VLM, atenuadas mediante pases en conejos (lapinizadas), poseían virulencia residual. La vacunación de los cerdos jóvenes era seguida de los signos clínicos de La FPC y la vacunación de las cerdas preñadas causaba la infección intrauterina de los fetos, provocando desordenes de la reproducción (Dune y Clark, 1968). El uso de estas vacunas por consiguiente fue prohibido en muchos países. Hace dos décadas fue posible, la vacunación con VLM "cepa" lapinizada China "C" sin virulencia residual; la vacuna adaptada a cultivos celulares de cuyes, "cepa" japonesa GPE y la "cepa" Thiveral Francesa, adaptada a las células PK-15; después, las últimas dos "cepas" fueron clonadas y seleccionadas mediante su crecimiento a 30 C (y fueron llamadas "cepas" frías. La primera y la última "cepas" son consideradas inocuas para las cerdas preñadas y para los lechones de dos semanas de edad. Ellas retienen sus propiedades atenuadas después de 20 a 30 pases en los cerdos susceptibles. (Thomas 1966 y Sasahara, 1976) y proveen seguridad cuando son provados en los cerdos inmunosuprimidos mediante el tratamiento con prednisolona (Florent *et al*, 1969; Aynaud *et al*, 1971; Kamijyo *et al.*, 1976). Estudios realizadas con las "cepas" C y GPE, han mostrado que esos virus vacunales se replican en el tejido linfoide, especialmente en las tonsilas (Torlone *et al* 1969;

Sasahara, 1970). La diseminación del virus vacunal de los cerdos vacunados a los susceptibles puestos en contacto, ha sido detectada con las tres "cepas". Ya no reversiona la virulencia de estas "cepas" bajo condiciones de campo, es debida a su estabilidad genética (Ramírez y Reynosa, 1993).

Las tres "cepas" MLV confieren una inmunidad rápida y perdurable. Los cerdos resisten el desafío después del 5o día de la vacunación y la inmunidad persiste por lo menos por 2 ó 3 años. Con respecto de los riesgos de usar la vacunación con MLV con una potencia inadecuada Launen and Strobbe (1977) expresaron que los cerdos vacunados con una dosis protectora del 50% (DPC₅₀), o menos con la cepa C, pueden convertirse en portadores, y las cerdas preñadas pueden transmitir el virus de campo en forma horizontal, y vía de la placenta, al ser expuestas al VFPC virulento. Una mínima potencia de 100 DPC₅₀, fue recomendada. La descendencia de las cerdas vacunadas con la "cepa" C es protegida hasta las 5 semanas de edad, de la infección letal, pero no contra la multiplicación y distribución del virus (Terpstra, 1977). Por otro lado, los anticuerpos derivados del calostro pueden causar largamente por fallas de la vacunación en los cerdos nacidos de cerdas inmunizadas. Estudios extensivos con vacunas modernas de VLM han mostrado que por lo menos 80% de los cerdos pueden ser vacunados con éxito a la edad de 6 semanas (Sasahara, 1970; Terpstra and Tielen, 1976; Launais *et al.*, 1978). La influencia supresiva de los anticuerpos maternos puede ser reducida utilizando una dosis vacunal incrementada (Lin *et al.*, 1982) y entonces ya pueden ser vacunados los cerdos recién nacidos, después de alimentarse del calostro (Lee *et al.*, 1982).

La vacunación masiva de cerdos con aerosoles ha sido ensayada en el pasado con resultados variables (Dunne, 1973). Muy recientemente ha sido reportada la inmunidad satisfactoria en los cerdos expuestos a aerosoles de la "cepa" C propagada en cultivos celulares, aplicando la vacuna en cuartos con temperatura y humedad controlada (Kaden and Glaner, 1982).

La experiencia en Europa ha proveído dudas sobre si es posible erradicar la FPC de áreas enzoóticas, mediante régimen estricto y sistemático de vacunación aplicado por un largo tiempo y apoyando la vacunación con policías veterinarios y con medidas zoonosanitarias (Terpstra and Robijns, 1977). Una buena conclusión que se ha obtenido es que los regímenes no sistemáticos, o incompletos, basados en medidas meramente suplementarias para el control de la enfermedad darán como resultado el que el número de brotes aumente, meses después de que la vacunación ha sido decontinuada. Para que la vacunación sea efectiva, ésta debe ser obligatoria y los animales vacunados deben ser identificados, para reconocerlos fácilmente, con un marcaje en la

oreja. Debido al movimiento de los cerdos vacunados tienden a ser reemplazados rápidamente por un lote de los cerdos jóvenes no inmunes. Para mantener el alto grado de inmunidad, se requiere de pequeños focos de virus residual, complementario a la vacunación entre las 6 y las 10 semanas de edad. Elementos significativos son el tipo de cerdo, el tipo de granja, la densidad de la población de los cerdos comerciales, el transporte, la presencia del virus en la cadena de alimentos, el grado de extensión.

Bajo ciertas condiciones una cerda preñada se puede infectar antes, o poco infectada después de la vacunación, puede permanecer dando a la camada el líquido infectado persistentemente. Aunque la camada infectada gradualmente sucumbirá al La FPC, la infección puede ser perpetuada subclínicamente algunas veces en los cerdos, lo cual tienen menos inmunidad maternal antes de comenzar la vacunación. Por estas razones, la vacunación complementaria debe ser continuada por lo menos en un año después de empezar la campaña de una vacunación masiva. Se sabe que menos del 5% de los cerdos presenta resistencia natural (genética) a la FPC. La inmunidad puede ser adquirida en forma pasiva mediante la aplicación por vía parenteral de sueros hiperinmunes; o en los lechones recién nacidos, mediante la ingestión de calostro, procedente de las madres inmunes. La inmunidad adquirida en forma activa se puede inducir mediante la infección cuando los cerdos reciben dosis subletales del virus virulento. O mediante la aplicación de vacunas, tales como: a) Virus vivo lapinizado (de alto y bajo pasaje); b) Virus vivo atenuado en cultivos celulares; c) Virus inactivado; d) Virus de la diarrea viral bovina (experimental) (Correa, 1981).

La primera forma de protección contra la FPC utilizada en los EUA, consistió en la aplicación de suero hiperinmune. Posteriormente se utilizó la aplicación simultánea de suero hiperinmune con virus virulento y se encontró que este método confería inmunidad estable y duradera. Sin embargo, este método tiene la desventaja de que difunde el virus virulento, razón por la cual este tipo de inmunización fue el primero en ser discontinuado en los EUA, e incluso también en México (Correa, 1981).

Las vacunas de virus vivo poco atenuado lapinizado (de bajo pasaje) se recomienda aplicarlas simultáneamente con suero hiperinmune. Algunas de estas vacunas han sido obtenidas, únicamente mediante pases en conejos. Otras, mediante pases en conejos y en los cerdos; estas últimas son más patógenas. Algunas pueden llegar a producir inmunidad por dos años. Tienen la desventaja de que producen reacciones posvacunales, en ocasiones severas, que difunden el virus vacunal poco atenuado de los cerdos vacunados a los susceptibles puestos en contacto, y en esta

forma, el virus puede revertir a la virulencia, después de varios pases los cerdos. Si se aplican sin suero, o acompañadas de suero con potencia insatisfactoria, se puede producir hasta un 20%-40% de mortalidad (Correa, 1981).

En varios países de Europa, Asia y América, se utiliza la vacuna de virus vivo lapinizado (de alto pasaje), "cepa" China, que de acuerdo con la literatura ha dado resultados altamente satisfactorios. Las vacunas de virus vivo atenuado mediante pases en cultivos celulares, pueden ser elaboradas en: *a)* células de riñón de cerdo; *b)* células de riñón de bovino; *c)* leucocitos de cerdo, etc. En la práctica se prefieren las vacunas preparadas en líneas celulares libres de contaminantes, ya que los cultivos primarios pueden contener virus u otros agentes infecciosos. Estas vacunas son muy recomendables porque producen excelente inmunidad. y de acuerdo con sus laboratorios productores, con algunas de ellas no hay bloqueo sérico, ni bloqueo por anticuerpos maternos. Algunas se recomienda aplicarlas con suero hiperinmune y otras sin suero (Correa, 1981). Algunas de estas vacunas vivas poco atenuadas tienen la desventaja de que se difunde el virus de los vacunados a los animales susceptibles puestos en contacto. Las vacunas inactivadas tienen ventaja de que no difunden el virus. Sin embargo, se pueden encontrar lotes de vacunas mal inactivadas, que puede ocasionar brotes de la FPC. A partir de la tercera semana después de la vacunación, estimulan inmunidad que puede durar hasta 10 meses. Estas vacunas inactivadas son inefectivas si se aplican en combinación con suero, aunque hay controversias al respecto. Es preferible aplicarlas por vía subcutánea, porque por vía intradérmica son menos efectivas. Después de vacunar 3 veces a las madres, los lechones recién nacidos adquieren protección, través del calostro, que les puede durar hasta las 13 semanas de edad. Es poco efectiva cuando se aplica a lechones de madres inmunes. Pero generalmente es efectiva en los cerdos mayores de 10 semanas de edad. Se prefiere aplicarla dos veces, con un intervalo de separación de 7 a 14 días. Los cerdos vacunados en esta forma, al ser expuestos con virus virulento, lo excretan durante el 2o y 5o días después de la exposición; y al aplicar tres vacunaciones se impide esta excreción de virus virulento. Se elaboran principalmente con sangre infectante desfibrinada, adicionada de cristal violeta (Correa, 1981; Ramírez y Reynoso, 1993).

En varias pruebas experimentales realizadas por Baker *et al* 1969, se encontró que el virus de diarrea viral bovina (BVD) "Cepa" New York 1, protegió contra un gran número de "cepas" virulentas de la FPC, incluyendo 8 de las más virulentas colectadas por el Departamento de Agricultura de los EUA. En los cerdos SPF, protegió al 100% contra la "cepa" de explosión Ames. La cepa BVD-Andy 1 proviene de la BVD-NY 1, es una cepa que fue pasada 17 veces en los cerdos. No produce ninguna enfermedad en los cerdos y ha sido estudiada en México, en donde se ha encontrado que protege contra el virus virulento Ames (83%) (Carbrey, 1977). También se ha estudiado en el INIP, SAGAR, México, la cepa vacunal PAV-250, obtenida en la Universidad de Cornell mediante 250 pases en cultivos celulares (Correa *et al*, 1975).

Esta vacuna tiene la ventaja de que, además de su alto índice de protección, no se difunde de los cerdos vacunados a los cerdos susceptibles puestos en contacto, según pruebas realizadas en los cerdos (Correa *et al*, 1975). Esto la coloca en un plano superior a las existentes, que sí se diseminan. Las vacunas con esta característica son las elegibles para una campaña de erradicación basada en la vacunación extensiva, ya que al no difundirse, no se corre el riesgo de que reviertan a la virulencia. De modo que se puede incluso vacunar a los cerdos de una granja sin peligro de que aborten las hembras gestantes que estén en contacto con los vacunados. Al utilizar otras vacunas, poco atenuadas que sí se transmiten por contacto a las hembras gestantes susceptibles, se podrá presentar mortalidad de fetos; o algunos cerditos de los que logren nacer vivos, podrán ser portadores de la FPC, lo cual podría establecer focos de infección. También se ha estudiado en México, en pruebas de laboratorio, la vacuna PAV-250 combinada con la cepa DVB Andy 1, con resultados de 100% de protección (Correa *et al*, 1974; Correa *et al*, 1975; Correa *et al*, 1994; Lee *et al* 1976) estudió en Taiwán la cepa China (LPC) con excelentes resultados de inocuidad y protección. La cepa de DVB-NY 1, no es patógena para los cerdos (8).

La vacunación de las hembras gestantes es un tema delicado, puesto que la utilización de virus vivo, poco atenuado en el primer mes de la gestación, puede producir alteraciones en los producto, tales como: ascitis, edema subcutáneo en el mezocolon, edema subcutáneo y perirrenal zonas de congestión en el hígado, asimetría de la cabeza, malformación de las piernas y de la nariz y diseminación de virus virulento. Si se vacuna al final de la gestación pueden nacer cerditos muertos, o bien, cerditos débiles. Por otra parte la vacunación de hembras gestantes con virus muerto puede realizarse en cualquier momento y no debe producir ningún problema, excepto cuando se utilizan lotes de vacunas mal inactivadas y que por lo tanto podrán contener virus virulento; o lotes de vacunas con potencia insatisfactoria, que no inmunizarán (Correa, 1981; Ramírez y Reynoso, 1993).

En el INIP (ahora INIFAP, CENID-Microbiologia-SAGAR) se ha comprobado la potencia de diferentes tipos de vacunas y de sueros comerciales contra la FFC (Correa, 1972; Correa *et al.*, 1975). Se puede observar que se estudiaron cinco vacunas de virus vivo atenuado, producidas en cultivos celulares, las cuales mostraron ser inocuas y con potencia satisfactoria (100%), por lo que fueron consideradas como recomendables. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que de acuerdo con las investigaciones de Philips (1966), los virus vivos vacunales poco atenuados, utilizados entonces se transmían de los cerdos vacunados a los cerdos susceptibles puestos en contacto. Por otra parte, las "cepas" poco atenuadas podrian ser peligrosas al vacunar hembras gestantes; e incluso para las hembras gestantes puestas en contacto con los vacunados con estas vacunas (Correa, 1981). Por otra, se ha comprobado que la vacuna PAV-250, no es patógena para los cerdos en gestación, o en celo (Baéz *et al.*, 1994).

El lote estudiado de una vacuna lapinizada de bajo pasaje (aplicada sin suero) causó 100% de morbilidad y 20% de mortalidad. Los sobrevivientes resistieron perfectamente a la exposición con virus virulento. Este tipo de vacunas representan un peligro, porque se ha demostrado que independientemente de que los virus vacunales poco atenuados se apliquen con suero hiperimmune o sin él, se diseminan de los cerdos vacunados a los cerdos susceptibles puestos en contacto. Algunos artrópodos también pueden contribuir a la diseminación del virus. Las vacunas lapinizadas de bajo pasaje que requieren ser aplicadas con suero hiperimmune contra la FPC, tienen también la desventaja de que siempre se necesitará que existan laboratorios productores de suero hiperimmune (Correa, 1981). Esto significa que siempre habrá focos de infección en los lugares donde sean producidos los sueros, puesto que para ello se requiere de utilizar grandes cantidades de virus virulento, el cual será inoculado en los cerdos que generalmente están a la intemperie. Por otra parte, inicialmente se probaron los sueros hiperinmunes contra la FPC de 4 diferentes laboratorios comerciales y se encontró que 2 de ellos protegían 0%, mientras que los otros 2 producían un 90% de protección. Posteriormente, se repitieron las pruebas con otros lotes de uno de los sueros que protegió 0% y se encontró que después protegió al 40% y que la máxima protección que ofreció fue de 90%, lo cual aún está abajo del mínimo aceptable, que oficialmente es de 100%. Estudios posteriores realizados por Madrid y Correa (no publicado), con 3 diferentes sueros comerciales, dieron resultados similares (0, 14 y 89% de protección). Al estudiar un lote de una vacuna contra la FPC, inactivada con cristal violeta, se observó que produjo abscesos en el lugar de la inoculación y que confirió 0% de protección (Correa, 1981; Ramírez y Reunoso, 1993).

1.8. VACUNAS.

Una breve descripción de las vacunas utilizadas para La FPC en diferentes épocas y partes del mundo. Clasificando a las vacunas de La FPC por generación (Ramírez y Reynoso, 1993).

1.8.1. -PRIMERA GENERACION (1908-1936).

1.-Virus vivo virulento (sangre febril) más Suero Hiperinmune.

Para usarse el método "simultáneo" o el método "suero-virus". El antígeno era obtenido a partir de sangre virulenta con anticoagulante o de molienda de órganos (bazo) cosechado de animales previamente inoculados y en proceso de viremia febril. El suero "anticolera" (Sorice *et al*, 1908) era obtenido de la sangre de los cerdos hiperinmunizados con VLa FPC. La sangre de estos animales se desfibra y se trata con un extracto de frijoles y 1% de cloruro de sodio, lo que permite remover por completo los glóbulos rojos. El suero restante debe ser pasteurizado a 58 a 59 C y preservado con fenol a la dilución final de 1%.

Este método de vacunación con virus virulento y suero hiperinmune, cuando es bien llevado, es altamente efectivo y produce inmunidad rápida y duradera. Sin embargo el uso de este sistema significa la constante diseminación, de la enfermedad, a través de este sistema de vacunación, porque utiliza virus virulento, produciendo en ocasiones, brotes de la enfermedad más severos que la forma natural, por no tenerse titulada la potencia del antígeno o del suero (Ramírez y Reynoso, 1993).

1.8.2. SEGUNDA GENERACION (1936-1956)

1.-Vacuna de Cristal Violeta.

Fue la primera vacuna desarrollada de virus inactivado. Se prepara a partir de sangre desfibrada o bien de molienda de órganos (bazo y otros tejidos, reticulo endoteliales a los cuales se les agrega cristal violeta y glicerina). Produce inmunidad por aproximadamente 10 meses, no disemina el virus, cuando esta bien preparada pero no protege cuando se usa simultáneamente con suero.

2.-Vacuna de Boynton.

La vacuna de Boynton hecha con Glicerina y Eucaliptol, la cual confiere inmunidad por aproximadamente 6 meses.

1.8.3-TERCERA GENERACION (1960-1970).

1.-Vacuna Homotípica de Virus Vivo de bajo pasaje (modificada en los cerdos y conejos).

La vacuna se obtiene atenuando al VFPC mediante una serie de pases consecutivos en conejos (vacuna lapinizada) o pases alternos de conejos a los cerdos (vacuna atenuada origen cerdo). La vacuna induce altos niveles de protección: la inmunidad se desarrolla entre los 4-7 días y dura varios años. Pero el grado de atenuación puede no ser suficiente. La seguridad y la estabilidad genética es el principal problema en la práctica, porque después de vacunar los animales manifiestan varios los signos de La FPC y en cerdas susceptibles de 24 a 60 días de gestación provoca desordenes reproductivos. Además, no es posible distinguir las "cepas" de baja virulencia de derivadas del virus vacunal de las "cepas" de campo de baja virulencia del VFPC. En los EUA (1969), se eliminó la vacunación con virus vivo para facilitar la erradicación de la FPC.

2.-Vacuna Heterotípica de Virus Vivo de BVD.

Por la relación antigénica existente entre la VFPC y el virus de la DVB, se ha propuesto inmunizar contra la VFPC, utilizando el VDVB, pero la protección es solo parcial. Por otra partes las "cepas" del virus de BVD atraviezan placenta e infectan a los fetos; y en condiciones de campo causa interferencia con las pruebas para el diagnóstico de la FPC. El uso de la vacuna del VDVB no se aprueba en los cerdos.

1.3.4. CUARTA GENERACION (1968-1970)

1.-Swine Buffy Coat Cell Line.

Vacuna que incorpora la cepa "CJ" del virus vivo modificado de La FPC, por crecimiento continuo en leucocitos de sangre porcina. El virus de La FPC virulento se somete a una serie de 12 pases, a intervalos de 4 días en cultivo de línea celular SBC. En cada pase del virus, los fluidos fueron diluidos más de 30 veces. Los cerdos vacunados con SBC desarrollan signos clínicos de La FPC y su consecuente muerte. La inoculación con SBC es segura si se aplica simultáneamente (en una área diferente del cerdo), suero hiperinmune o anticuerpos contra la FPC, desarrollando títulos altos que duran hasta los 204 días.

1.3.5. QUINTA GENERACION (1975-1992).

1.-Vacunas Modernas de Virus Inactivado.

Esta vacuna se basa en separar el VFPC, de los cultivos celulares infectados, por medio de un detergente (Triton x-100). El detergente desdobra al VFPC, en adyuvante incompleto de Freund's, o en una saponina (Quil A), solución que protege al cerdo contra cambio virulento. Algunos detergentes heterólogos desdoblan las vacunas preparadas con el virus de la Diarrea Viral Bovina (VBVD) pero la protección contra cambios del VFPC es sólo parcial. La aplicación de 10 ml. del antígeno VFPC confiere protección completa al cerdo.

1.3.6. SEXTA GENERACION (1952-1992),"CEPAS" DE "ALTO PASAJE"

Vacunas derivadas de las "cepas" siguientes: 1.-Cepa CHINA; 2.-Cepa GPE-; 3.-Cepa CL.; 4.-Cepa CR20.; 5.-Cepa MINESOTA; 6.-Cepa PAV-1; 7.-Cepa PAR-147; 8.-Cepa PAV-

CARACTERISTICAS DE LAS "cepas".

1.8.6.1. CEPA CHINA LAPINIZADA.

La cepa China lapinizada (CLS) es también llamada "C" ó "K" (Países el este de Europa) ó "LPC" (Taiwan). La cepa LPC derivada de un virus de La FPC lapinizado ("Rovac"), con una serie de 250 pases en conejos en los Estados Unidos; asimismo por una serie de 800 pases en conejos en Taiwan. La CLS es altamente segura en cerdas gestantes y lechones recién nacidos. El alto grado de seguridad está demostrando por la buena estabilidad genética de la CLS, la cual es incapaz de recuperar su virulencia, aún después de 20-30 de pases en los cerdos de 6-8 semanas de edad. La inmunidad se establece a los 3-4 días después de la vacunación y permanece hasta los 18 meses.

1.8.6.2 CEPA GPE ^(*)

La cepa ALD virulenta del VLa FPC ha sido sujeta a un proceso de selección por medio de una serie de pasajes a baja temperatura (30 C), en tres diferentes sistemas de cultivos celulares incluyendo células de cerdo, bovino y cobayos, y alternando con virus clonado-Cepa ALD, como resultado de la clonación se denominó cepa GPE: -142 pasajes en células de testículos de porcino; 36 pasajes en células de testículos de bovino.; -41 pasajes en células de riñon de cobayos. Se ha detectado en tonsilas, heces y orina, entre lo 10 días posteriores a su aplicación. La protección se establece a partir del tercer día después de la vacunación, pero los anticuerpos neutralizantes se incrementan a las 2-3 semanas y persisten por más de 2 años. Esta "cepa" no se difunde, no revierte y es altamente inmunogénica (aunque todavía no está totalmente demostrado) (Comunicación personal).

1.8.6.3. "CEPA" PAV-1.

La ""cepa"" PAV-1 se emplea en la elaboración de vacunas con virus activo atenuado, multiplicado en leucocitos de cerdo, se aisló en la Universidas de Cornell y se designó como tipo "A". La protección inmune dura mínimo 170 días.

1.8.6.4. "CEPA" CL.

Deriva de la ""cepa"" "C" (20 pases en conejos), con 17 pases en células de riñon de cordero. Se utiliza en Europa, Asia y Sur de América.

1.8.6.5. "CEPA" CR 20

Deriva de la "C" (Dr. Bogner, Hungría;) con 20 pases en conejos.

1.8.6.7. "CEPA" PAV-250.

"CEPA" vacunal PAV-250, obtenida de la Universidad de Cornell mediante 250 pases en cultivos celulares. Esta vacuna tiene la ventaja de su alto índice de protección, no se difunde de los cerdos vacunados a los cerdos susceptibles puestos en contacto. Es altamente segura en cerdas gestantes y lechones recién nacidos. No es patógena para el embrión. La vacuna PAV-250 es completamente inocua y confiere excelente protección tanto en pruebas de campo, como en pruebas controladas de laboratorio.

1.8.7. SEPTIMA GENERACION (1975-1992).**1.-"CEPA" Thiverval**

La ""cepa"" Thiverval es una clona, es aislada apartir de la ""cepa"" Alfort virulenta, en cultivos celulares (PK-15) después de una serie de 170 pasajes a 29-30 C, incluyendo 65 pases en los que se usó el método de dilución del virus clonado.

Se caracteriza por varios marcadores genéticos asociados con la atenuación que facilitan la identificación de la ""cepa"". La ""cepa"" Thiverv es de alta seguridad en cerdas gestantes y en los lechones recién nacidos. Los anticuerpos neutralizantes son detectados a los 7 dias postvacunación. El nivel máximo de anticuerpos en el suero se observan al mes de la vacunación y estos persisten constantemente por varios años.

1.3.3. "CEPAS" VACUNALES PERMITIDAS EN MEXICO.

Las vacunas contra la La FPC que se utilizan en México, autorizadas por la Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural (SAGAR), son las presentadas en la Tabla 1.

TABLA. No. 1. VACUNAS CONTRA LA FPC POR LA SAGAR EN MEXICO.

NOMBRE DE LA VACUNA	TIPO DE VACUNA	LAB PRODUCTOR	"CEPA"
CLASIVAC PLUS	VIRUS ACTIVO MODIFICADO	PRONABIVE	GPE (6)
COLVASAN	VIRUS ACTIVO MODIFICADO	SANFER	PAV-250
PORCIVAC	VIRUS ACTIVO ATENUADO	HOECHST	PAV-1
NORVAC GPE	VIRUS ACTIVO MODIFICADO	PFIZER*	GPE (6)
VADIMUN	VIRUS ACTIVO ATENUADO	PFIZER*	CHINA
INGLEVAC	VIRUS ACTIVO MODIFICADO	ANCHOR	MINNESOTA
CERTIGEN	VIRUS ACTIVO MODIFICADO	CYANAMID*	MINNESOTA
CERIVONG	VIRUS ACTIVO MODIFICADO	CYANAMID*	CHINA LAPINIZADA
VAC vs La FPC	VIRUS ACTIVO MODIFICADO	BIO-ZOO	PAR-147**
PAV-PLUS-250	VIRUS ACTIVO MODIFICADO	PRONAVIBE	PAV-250**
VAC-PAV-250	VIRUS ACTIVO MODIFICADO	LITTON	PAV-250

*= NO SE SABE SI LA SEGUIRÁN PRODUCIENDO ACTUALMENTE

**= TIENEN LICENCIA, PERO NO LA PRODUCEN

1.9. BIBLIOGRAFIA

Aynaud J.M., 1968. Étude de la multiplication in vitro d'un clone du virus de la peste porcine. *Rech. Vét.*, 1:25-36.

Aynaud, J.M., LeJolly, J.C., Bibard, C, and Galicher, C., 1971. Étude des propriétés de mutants froids du virus de la peste porcine classique. Application à la vaccination. *Bull. Off. Int. Epizoot.*, 75:654-659.

Baker, J.A., L. Coggins, D. Robson, B.E. Sheffy and J. Volenec, of the *JIS* (12):1866-1873, 1969.

Cabrera, T.A., 1991. Logros y avances de la campaña contra la Fiebre Porcina Clásica. *Sintesis Porcina XII*.

Caij, A.; Muyldermans, G. De Smet A, Hamers, R. and Koenen, F. 1993. Production and characterization of monoclonal antibodies against hog cholera virus (Alfort 187 strain). *Arch Virol*. 131: 185-192.

Carbrey, E.A., Stewart, W.C., Kresse, J.I. and Snyder, M.L., 1977. Inapparent hog cholera infection following the inoculation of field isolates In: *CEC seminar on Hog Cholera/Classical Swine Fever and African Swine Fever*, Hannover, EUR 5904. pp 214-230.

Casas, J.L., E. Mudespacher M., Martell, 1976. Congress, Ames, Iowa, USA.

Charley, B., Corthier, G., Houdayer, M. and Rouzé, P., 1980. Modifications des reations immunitaires au cours de la peste porcine classique. *Ann. Reach. Vét.*, 11:27-33.

Chen, C.S., T.S., Huang, T.C. Lin and B.E. Sheffy. 1976. Proccedings PVS. Congress, Ames, Iowa, USA. Proccedings IPVS , p. 11..

Cheville, N.F., and Mengeling, W.L., 1969. The pathogenesis of chronic hog cholera (swine fever). Histologic, immunofluorescent, and electron microscopic studies. *Lab. Invest.*, 20: 261-274.

Cheville, N.F. and Mengeling W.L and Zinober, M.R., 1970. Ultrastructural and immunofluorescent studies of glomerulonephritis in chronic hog cholera. Lab. Invest, 22: 458-467.

Correa-Girón, P. 1981. Cólera porcino. In: Enfermedades virales de los animales domésticos (monogástricos), Vol 1. 4ª Edición. Editor por Correa-Girón. Coordinación y Producción. Arte e Impresos B.J., pp 7-28.

Correa, G.P, Nadia Mancisidor, María del Carmen Ochoa, J. Aguirre y F. Larios. Inocuidad y potencia de vacuna contra la Cólera Porcino. Resúmenes de la XI reunión Anual del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, 11 al 16 de Febrero. México, D.F., p.p. 10-11, 1974.

Correa-Girón, P. y C. Ugarte R. (1972). Potencia de sueros y vacunas comerciales contra el cólera Porcino. Téc. Pec. Méx., 21: 47.

Correa-Girón, P., J.A. Baker, B.E. Sheffy, María del Carmen Ochoa y Nadia Mancisidor A. (1975). Una vacuna mejorada para controlar el Cólera Porcino. 29; 34-40, 1975.

Correa, G.P., Caba, A., Ma. Baez, R.U., Anaya, E.A. 1994. Protección conferida por la vacuna PAV-250, contra la Fiebre Porcina Clásica al vacunar cerdos de 1,7,15 y 21 días de edad. porcirama. Vol.4. pp 6-15.

Coggins, L. B.E., Sheffy and J. Baker. Response swine to Hog Cholera Vaccines. Proc. U.S. Livestock San A. 66:316-323.

Coggins, L. B.E, 1964. Study of Hog Cholera colostral antibody and its effect on active Hog Cholera immunization . Am. J. Vet. Res. 25:613-616.

Corthier, G., 1978. Cellular and humoral immune-response in pigs given vaccinal and chronic hog cholera viruses, Am, J, Vet, Res., 39: 1841-1844.

Corthier, G., Aynaud, J.M., Galicher, C and Gelfi, J., 1974. Activité antigénique comparée de deux togavirus: le virus de la peste porcine et le virus de la maladie des muqueuses, Ann. Rech. Vét., 5: 373-393.

Corthier, G., Labadie, J.P. and Petit, E., 1977. Response immunitaire humorale et cellulaire du porc consécutive à la vaccination ou à Infection subclinique par le virus de la peste porcine classique. Bull, Acad, Vét. Fr., 50: 425-433.

Dorset M., McBryde, C.N., Nile, W.B., Rietz, J.H., 1919. Observations concerning the dissemination of hog cholera by insects. J. Am. Vet. Med. Assoc. (14):55-60.

Dunne, H.W., 1964. Hog cholera In: H.W. Dunne (Ed), Diseases of Swine, 2nd ed. Iowa State University Press. Ames, IA, pp. 140-186.

Dunne, H.W., 1973 Hog cholera (European Swine fever). Adv. Vet. Sci. Comp. Med., 17: 315-359.

Dunne, H.W., 1975. Hog cholera In: H.W. Dunne and A.D. Leman (Eds.), Diseases of Swine, 4th ed. Iowa State University Press, Ames, I.A. pp 189-255.

Dunne, H.W. and Clark, C.D., 1968. Embryonic death, foetal mummification, stillbirth and neonatal death in pigs of gilts vaccinated with attenuated live-virus hog cholera vaccine, Am. J. Vet. Res. 29: 787-796.

Florent, A. Thomas, J and Leunen, J., 1969 Contrôles des vaccins contre la peste porcine. Interer de Immunodepression pour la mise evidence de la virulence residuelle, Bull. Off. Int Epizoot., 72: 665-669.

Fuchs, F., 1968. Schweinepest. In: H Röhrer (Ed), Handbuch der Virusinfektionen bei tieren, Band III. Gustav Fischer Verlag, jena, pp. 16-250.

Harding, J, D.J., Done, J.T. and Darbyshire, J.H., 1966. Congenital tremors in piglets and their relation to swine fever. Vet. Rec., 79: 388-390.

Holm Jensen, M., 1981 Detection of antibodies against hog cholera virus and bovine viral diarrhea virus in porcine serum. A comparative examination using CF. PLA and NPLA assays. Acta. Vet. Scand., 22:85-98.

Huck, R.A. and Aston, F.W., 1964. The carrier sow in swine fever. Vet. Rec., 76: 1151-1154.

- Karden, V. and Glaner, M., 1982. Zum Eintritt und zur Dauer der Immunität gegen Schweinepest nach aerogener Immunisierung. *Arch. Exp. Veterinaermed.*, 36: 593-599.
- Kamijyo, Y., Ohkuma, S., Shimizu, M. and Shimizu, Y., 1976. Effect of dexamethasone on the multiplication of attenuated strains of hog cholera virus in piglets. *Microbiol.*, 1: 475-477.
- Kamijyo, Y., Ohkuma, S., Shimizu, M. and Shimizu, Y., 1977. Differences in pathogenicity and antigenicity among hog cholera virus strains. *Nat. Inst. Anim. Health Q.*, 17: 133-140.
- Komaniwa, H., Fukusho, A. and Shimizu, Y., 1981. Micromethod for performing titration and neutralisation test of hog cholera virus using established porcine kidney strain. *Nat. Inst. Anim. Health Q.*, 21: 153-158.
- Kom, G., 1964. Über sensibilisierende Wirksamkeit sehr schwachvirulent nicht immunisierenden Schweinepestvirus sowie einer hochgradigen Virulenzsteigerung durch den sensibilisierten Organismus, *Zentralbl. Veterinaermed. Beih.*, 11: 119-134.
- Kom, G. and Matthaeus, W., 1977. die Schweinepestkrankheit als virus-induzierte Störung des Enzymsystems: Zur Pathogenität von Pankreassuspensionen und Chymotrypsin (ogen). *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I. Orig. Reihe A*, 238: 20-34.
- Kubin, G., 1967 *In vitro* Merkmale des Schweinepestvirus. *Zentralbl. Veterinaermed. Beih.*, 14: 542-543.
- Kumagai, T., Shimizu, T., Theda, S. and Matumoto, M., 1961. A new in vitro method (END) for detection and measurement of hog cholera virus and its antibody by means of effect of HC-virus in swine tissue culture. I. Establishment of a standard procedure, *J. Immunol.*, 87: 245-256.
- Launais, M., Aynaud, J.M. and Corthier, G., 1978 Hog cholera virus: Active immunisation of piglets with the Thiverval strains in the presence and absence of colostral passive immunity. *Vet. Microbiol.*, 3: 31-43.
- Lee, R.C.T., Wang, J.T., Lai, S.S., Wu, F.M. and Lin, T.T.C., 1982 Studies on pre-colostral vaccination against hog cholera using an attenuated virus, LPC-China strain. In: *Proc. Intern. Pig Vet. Soc. Congr., México City*, p.133.

Leunen, J. and Strobbe, R., 1977. Capacity of attenuated swine fever vaccines to prevent virus carriers in the vaccinated pigs after contact with field virus Arch. Exp. Veterinaarmed., 31: 533-536.

Lies, B. and Prager, D., 1976. Detection of neutralizing antibodies (NIF test): use of a new technical equipment (CCSC system) for laboratory swine fever diagnosis: In: CEC seminar on Diagnosis and Epizootiology of Classical Swine Fever. Amsterddam. EUR 5486, pp 187-197.

Liess, B., Frey, H.R., Prager, D., Hafez, S.M. and Roeder, B., 1976. The course of natural swine fever virus infection in individual swine and investigations on the development of inapparent SF infections In: CEC seminar on Diagnosis and Epizootiology of Classical Swine Fever, Amsterdam, EUR 5486, pp. 99-113.

Liess, B., Frey, H.R. and Prager, D., 1977. Antibody response of pigs following experimental infections with strains of hog cholera and bovine viral diarrhoea virus In: CEC seminar on Hog Cholera/Classical Swine Fever and African Swinw Fever, Hannover, EUR 5904, pp. 200-213.

Lin, T.T.C., Lai, S.S., Chen, C.S. and Lee, R.C.T., 1982. Immune response to different doses of LPC-China virus in pigs with different levels of colostral hog cholera antibody In: Proc. Intern Pig. Vet. Soc. Congr., México City, p. 132.

Mahnel, H. and Mayr, A., 1974. Schweinepest. Infektionskrankheiten und ihre Erreger. Band 16 VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1974.

Matthaeus, W. and Korn, G., 1966. Serumproteinveränderungen und klinische Symptome bei verschiedenen Verlaufsformen der Schweinepest. Zentralbl. Veterinaarmed. Beih., 13, 558-569.

Mengeling, W.L., 1970. Endogenous neutration of virus during fatal hog cholera illnes. Am. J. Vet. Res., 31: 91-95.

Mengeling, W.L. and Cheville, N.F., 1968. Host response to persistent infection with hog cholera virus. Proc. Ann. Meeting U.S. Livestock San. Assoc. 72: 283-295.

Mengeling, W.L. and Drake, L., 1969. Replication of hog cholera virus in cell culture, Am. J. Vet. Res., 30: 1817-1823.

Mengeling, W.L. and Parker, R.A., 1969. Pathogenesis of Chronic hog cholera host response, Am. J. Vet. Res., 30: 409-417.

Miller, L.D., Downing, D.R., Morgan, N.O., 1974. Transmission of hog cholera by flies. Recovery of virus from flies following exposure to infective blood. proc. Ann. Meeting. US Livestock San Assoc. 78: 324-330.

Mouwen, J.M.V.M and De Groot, E.C.B.M., 1983. Atlas of Veterinary Pathology Bunge, Utrecht, The Netherlands.

Ogawa, N., Nakagawa, H., Yamamoto, H., Sawada, M. Hanaki, T. and Sazawa, H., 1973. viral detection in pigs inoculated with the GPE strain of hog cholera attenuated virus. Annu. Rep. Natl. Vet. Assay. Lab., 10_: 15-19.

Pirtle, E.C. and Mengeling, W.L., 1971. Antigenic differences in two hog cholera strains. Am. J. Vet. Res., 1473-1477.

Ramírez Necoechea, R, Nuevos cuadros clínicos de Fiebre Porcina Clásica. Porcira No. 33, 1974 pag. 15.

Ramírez, N.R. y Reynoso, G.L., 1993. Fiebre Porcina Clásica. ALSA. Consultores, S.C.

Remond, M., Plateau, E. and Cruciere, C., 1981. *In vitro* study of the cellular response of pigs vaccinated against classical swine fever. Zentralbl. Veterinaermed, Beih., 28: 743-748.

Ressang, A. A., 1973. a. Studies on the pathogenesis of hog cholera.I. Demonstation of hog cholera virus subsequent to oral exposure. Zentralbl. Veterinaermed. Beih., 20: 265-271.

Ressang, A. A. 1973. b. Studies on the pathogenesis of hog cholera II. Virus ditribution in tissue and the morphology of the immune response. Zentralbl Veterinaermed. Beih 20: 265-271.

Ressang. A. A. and VanBekkum, J.G., 1972. The indirect flourescent antibody technique as a method for detecting serum antibodies against hog cholera. Part 1. An outline of the technique and its preliminary evaluation .Zentralbl. Veterinaermed. Beih., 16: 709-716.

Ressang, A. A., Van Bekkum, J.G. and Bool, P.H., 1972. Virus excretion in vaccinated pigs subject to contact infection with virulent hog cholera virus strains. *Zentralbl. Veterinaermed. Beih.*, 19: 739-752.

Sasahara, J., 1970. Hog cholera: Diagnosis and prophylaxis. *Natl. Inst. Anim. Health Q.*, 10: 57-81.

Sasahara, J., 1976. Further experiments on the GP vaccine of swine fever In: CEC seminar on Diagnosis and Epizootiology of Classical Swine Fever. Amsterdam, EUR 5486, pp. 67-82.

Schwarte, L.H., 1959. Our present knowledge of reservoirs and vectors of hog cholera virus. *Proc. Ann. Meeting U.S. Livestock San. Assoc.*, 63: 317-322.

Shope, R.E., 1958. The swine lungworm as a reservoir and intermediate host for hog cholera virus I. The provocation of masked hog cholera virus in lungworm infected swine by ascaris larvae *J. Exp. Med.*, 107: 609-622.

Sorce *et al.*, 1908. Citado en: Ramírez, N.R. y Reynoso, G.L., 1993. Fiebre Porcina Clásica. ALSA. Consultores, S.C.

Terpstra, C., 1976. Diagnosis of classical swine fever in the Netherlands. *In: CEC seminar on Diagnosis and Epizootiology of Classical Swine Fever.* Amsterdam, EUR 5486. pp 58-63.

Terpstra, C., 1977. The immunity against challenge with swine fever virus of piglets from sows vaccinated with C-strain virus. *Tijdschr. diergeneeskd.*, 102: 1293-1298.

Terpstra, C., 1978. Detection of C-strain virus in pigs following vaccination against swine fever *Tijdschr. Diergeneeskd.*, 103: 678-684.

Terpstra, C. and Tielen, M.J.M., 1976. Antibody response against swine fever following vaccination with C-strain virus. *Zentralbl. Veterinaermed. Beih.*, 23: 809-821.

Terpstra, C. and Robijns, K.G., 1977. Experience with regional vaccination against swine fever in enzootic areas for limited periods using C-strain virus. *Tijdschr. Diergeneeskd.*, 102: 106-112.

Terpstra, C., Bloemraad, M. and Gielkens, A.L.J., 1984. The neutralizing peroxidase-linked assay for detection of antibody against swine fever virus. *Vet. Microbiol.*, 9: 113-120.

Thomas, J., 1966. Stabilité génétique et atténuation du vaccin peste porcine souche 'chinoise'. Rapport de Recherches de L'Institut National de Recherches Vétérinaires, Uccle, Belgique.

Torlone, V., Titoli, F., Gialletti, L. and Skyrianos, G., 1969. Ricerca nel suino del virus attenuato della peste classica, ceppo lapinizzato cinese, a mezzo della immunofluorescenza. Atti. Soc. Ital. Sci. Vet., 23: 965-970.

Torrey, J.P. and Prather, J.K., 1963. Heat inactivation of hog cholera virus. I. Studies with defibrinated blood and serum. Proc. Ann. Meeting U.S. Livestock. San. Assoc., 67: 414-418.

Trautwein, G., Richter-Reichhelm, H.B., von Benten, K., Frey, H. and Liess, B., 1977. Experimental transplacental infection of pigs with swine fever virus *In*: CEC seminar on Hog Cholera/Classical Swine Fever and African Swine Fever, Hannover, EUR 5904. pp. 174-183.

Van Bekkum, J.C., 1966 Serological aspects of the vaccination against hog cholera with crystal violet vaccine. Tijdsch. Diergeneeskd., 91: 149-170.

Van Bekkum, J.G., 1976. Impact of control programs on the epizootiology of swine fever in the field *In*: CEC seminar on Diagnosis and Epizootiology of Classical Swine Fever. Amsterdam, EUR 5486. pp. 211-229.

Van der Molen, E.J. and Van Oirschot, J.T., 1981. congenital persistent swine fever (hog cholera). I. Pathomorphological lesions in lymphoid tissues, kidney and adrenal. Zentralbl. Veterinaermed. Beih., 28: 89-101.

Van Oirschot, J.T., 1977. A congenital persistent swine fever infection. II Immune response to swine fever virus and unrelated antigens. Vet. Microbiol., 2: 133-142.

Van Oirschot, J.T., 1980. Persistent and inapparent infections with swine fever virus of low virulence. their effects on the immune system. Thesis, State University of Utrecht, 1980.

Van Oirschot, J.T., 1983. Congenital infections with nonarbo togaviruses. Vet. Microbiol., 8: 321-361.

Van Oirschot, J. T. and Terpstra, C., 1977. A congenital persistent swine fever infections. I. Clinical and virological observations. Vet. Microbiol., 2: 121-132.

Van Oirschot, J.T., de Jong, d. and Huffels, A.D.N.H.J., 1981. Effect of infections with swine fever on immune functions. I. Response of lymphocytes from blood and lymphoid organs from infected and normal pigs to anti-immunoglobulin serum and protein A. Vet. Microbiol., 6: 41-57.

Van Oirschot, J.T., De Jong D. and Huffels, A.D.N.H.J., 1983 Effect of infections with swine fever virus on immune functions. II. Lymphocyte response to mitogens and enumeration of lymphocyte subpopulations. Vet. Microbiol., 8: 81-95.

Young, GA., Kitchell, R.L., Luedke, A.J. and Sautter, J.H., 1955. The effect of viral and other infections of the dam on fetal development in swine. I. Modified live hog cholera viruses immunological, virological and gross pathological studies, J. Am. Vet. Vet. Med. Assoc., 126: 165-171.

CAPITULO I

DIFERENCIAS BIOLÓGICAS ENTRE "CEPAS" DE CAMPO, DE REFERENCIA Y VACUNALES.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fué encontrar diferencias biológicas entre las "cepas" de campo, de referencia y vacunales, del virus de la FPC. Se adquirieron 5 "cepas" vacunales (China, GP, PAV-1, PAV-250), tres "cepas" de referencia (Lederle, ALD y Ames), también se trabajaron 9 "cepas" de campo (VC-91-039; VC-90-039 VC-89-55; VC-89-102; VC-89-55; VC-90-1591; VC-89-126; VC-90-127; VC-90-1234). Todas las "cepas" se cultivaron en la línea celular PK-15 y se cosecharon después de 4 días de incubación. Al mismo tiempo se adquirieron dos cerdos SPF, que se sacrificaron y de sus órganos linfoides se hicieron cultivos primarios de células no clasificadas, las "cepas" se inocularon en esta suspensión celular y se incubaron de 4 a 5 días, posteriormente se cosecharon, y se liofilizaron. A las 17 "cepas" se les determinó la concentración de proteínas y se titularon por inmunofluorescencia directa (IFD). En la determinación proteica se encontró que la concentración de proteínas fluctó en las "cepas" vacunales entre 82.00 y 87.40 $\mu\text{g/ml}$; en las "cepas" de referencia entre 86.8 y 88.41 $\mu\text{g/ml}$; mientras que en las "cepas" de campo 83.37 y 88.74 $\mu\text{g/ml}$. El medio de cultivo presento una concentración 79 $\mu\text{g/ml}$. Los resultados de los títulos por IFD, mostraron que las "cepas" vacunales estuvieron en un rango de $10^{5.1536}$ a $10^{6.5500}$; las "cepas" de referencia estuvieron en un rango de $10^{6.2374}$ a $10^{7.5405}$; y las "cepas" de campo de $10^{1.7567}$, a $10^{4.8446}$. Las "cepas" de campo tuvieron un comportamiento muy variable lo que se sugiere que existen "cepas" de diferente grado de patogenicidad.

SUMMARY

The objective of this work was to find biological differences among field, reference and vaccinal "strains" of Hog Cholerae virus. This work included 5 vaccinal "strains" (China, GP, PAV-1, PAV-250 and Minnesota), 3 virulent references "strains" (Lederle, ALD, and Ames) and 9 field "strains" (VC-91-039, VC-89-95, VC-90-95, VC-89-55, VC-90-1591, VC-89-126, VC-90-197, VC-90-123 and VC-89-102). All "strains" were inoculated in PK-15 cells and harvested 4 days later. At the same time, two SPF pigs were sacrificed to obtain primary cultures of unclassified cells from their lymphoid organ cells (not clasified). "Strains" were inoculated in cell cultures and 4 to 5 days later harvested and lyophilized. Protein concentration and titration by direct immunoflourescence (IFD) was performed to all "strains". Protein concentration fluctuated in vaccinal "strains" from 82 to 87.40 $\mu\text{g/ml}$ in field "strains" from 83.37 to 88.74 $\mu\text{g/ml}$ and reference "strains" from 86.8 to 88.41 $\mu\text{g/ml}$; control culture media has a concentration of 79 $\mu\text{g/ml}$. Titration with IFD showed that vaccinal "strains" titres were into a range of $10^{5.1536}$ to $10^{6.5500}$, references "strains" were from $10^{6.2374}$ to $10^{7.5405}$; and field "strains" from $10^{1.7567}$ to $10^{4.8446}$, these "strains" had a very variable pattern, suggesting the existence of field "strains" with different range of pathogenicity.

1. INTRODUCCION

La FPC, es una enfermedad altamente contagiosa, que afecta al sistema nervioso, endotelios vasculares y células reticuloendoteliales; se caracteriza por la presencia de hemorragias generalizadas e infartos en los órganos internos.

1.1. ASPECTOS EPIZOOTIOLÓGICOS DE LA FIEBRE PORCINA CLASICA.

La epizootiología de la FPC está influenciada por un gran número de factores, entre los cuales se pueden mencionar: el sistema de producción; el precio del cerdo; el precio de la carne, mucho hacinamiento, el tamaño y la densidad de la granja y de la región, y no menos importante la virulencia de la "cepa" del virus de la FPC circulante; esto aunado a las medidas aplicadas para el control o erradicación de la enfermedad, incluyendo regímenes de vacunación y métodos de diagnóstico utilizados. (Terpstra, 1988).

Se considera como un factor y es aceptado, la relación que existe entre el número de brotes y la densidad de las granjas en una cierta área. Además existen indicadores de una correlación positiva entre el número de brotes en una área y la producción de cerdos. En ciertas áreas hay un alto riesgo, ya que el virus tiende a establecerse por muchos años con una baja incidencia de la enfermedad. Liess *et al* (1975) demostraron que en más del 5% de las unidades en crecimiento, que son serológicamente positivas pueden presentarse períodos epizoóticos dentro de ella, con respecto a la FPC.

Existen evidencias circunstanciales que indican que el síndrome de la "cerda portadora" y los cerdos infectados en forma crónica y persistentemente, son otros factores responsables de mantener la infección en la granja, especialmente en piaras medianas y grandes. La estrecha relación entre el riesgo de infección, el tipo de granja; el tamaño de la piara; y las áreas de producción intensiva de cerdos. (Terpstra, 1988).

1.3. EVIDENCIACIÓN DE "CEPAS" DE DIFERENTES GRADOS EN PATOGENICIDAD.

En un trabajo realizado por (Caij., *et al.*, 1989), se encontraron diferencias cualitativas y cuantitativas en una gran variedad de tejidos estudiados, con respecto al título viral, cuando los cerdos fueron inoculados con dos diferentes "cepas" del virus de la FPC ("cepa" Weybridge o "cepa" New South Wales NSW). Los títulos encontrados con la cepa Weybridge, fueron más altos que los encontrados con la cepa NSW. Esta correlación correspondió con la fuerte severidad del síndrome clínico-patológico, inducida por la cepa Weybridge. La implicación de la diferenciación del virus de la FPC en tejidos mediante el diagnóstico por inmunofluorescencia fue discutible, quedando como conclusión que solo con el uso de anticuerpos monoclonales se podría diferenciar entre las "cepas" del virus de la FPC y las del virus de la Diarrea Viral Bovina (BVD).(Kresse *et al.* 1976).

Las infecciones persistentes son generalmente producidas por el virus de la FPC de baja a moderada virulencia. Se han encontrado diferentes formas de persistencia viral y arbitrariamente las identifican dentro de la forma crónica (Mengeling y Packer, 1969) y una forma de brote tardío (Van Oirschot y Terpstra, 1977). En el primer caso se distinguen tres fases clínicas denominadas: enfermedad aguda, mejoría clínica y exacerbación de la enfermedad aguda.

La fase aguda es esencialmente la misma, como ocurre con la FPC aguda, el virus se disemina más lentamente y las concentraciones en el suero y órganos, tiende ser menor. En el segundo período de Mejoría Clínica los títulos virales en el suero son bajos o ausentes y hay evidencia de una excesiva formación de células plasmáticas y de un incremento de inmunoglobulinas en el suero. El virus de la FPC tiende a limitarse a las células epiteliales de las tonsilas, y de tejidos del ileon, glándulas salivales y riñones. El virus desaparece temporalmente del suero, probablemente como resultado de la formación de anticuerpos específicos y/o disminución del número de células que producen al virus. Finalmente, en la tercera fase o exacerbación de la enfermedad aguda, el virus se disemina en todo el organismo, este puede ser provocado por el agotamiento del sistema inmune, que parece desarrollar cerdos infectados crónicamente. Estos animales se encuentran más susceptibles a las infecciones bacterianas secundarias (caso típico de una Pasteurelisis pulmonar, demostrado por Pijoan y Ochoa, 1978).

En el caso de la forma correspondientes a los brotes tardíos, la FPC se caracteriza clínicamente por un período inicial largo, con una virtual ausencia de signos clínicos; este tipo de infecciones generalmente siguen un curso posterior a una infección viral durante el período fetal, cuando la cerda se infecta con "cepas" de reducida virulencia; los lechones nacen con altos títulos virémicos, que son suprimidos temporalmente cuando ingieren el calostro. El virus de la FPC se encontrará difundido en todo el organismo, en los tejidos epiteliales, linfoides y reticulo-endoteliales. Estos cerdos no producen anticuerpos neutralizantes lo que contribuye a una viremia persistente.(Tersptra, 1988).

Esta serie de evidencias nos muestran claramente que el virus de la FPC se presenta en las granjas con diferente grado de virulencia, de tal manera que podemos observar su patogenicidad de la siguiente forma:

Las "cepas" de alta virulencia generalmente causan muerte en un período entre la segunda y tercera semana de edad, mientras que "cepas" de baja virulencia no producen la enfermedad a menos que los cerdos hayan sido infectados "in utero". Las epizootias producidas por "cepas" de baja virulencia difieren en tres aspectos de las causadas por las "cepas" virulentas.

1. Las "cepas" de baja virulencia inducen una alta proporción relativa de infecciones inaparentes, atípicas y crónicas, no dejando ver su presencia, como ocurriría con una cepa virulenta. Una piara en crecimiento que se encuentra infectada, puede transmitir el virus imperceptiblemente a un gran número de animales; mientras que en las piaras en engorda que también se encuentran infectadas, puede también no notarse la presencia del virus, generandose así una cadena de contaminación.

2. Se ha mencionado que la transmisión de "cepas" de baja virulencia, tienden a ser lenta a través de la piara, lo cual también contribuye al curso de la enfermedad en forma menos alarmante.

3. El síndrome de la cerda portadora, juega un papel altamente significativo en las epizootias causadas por "cepas" de baja virulencia. Mientras que las cerdas gestantes e infectadas con "cepas" virulentas, mueren, o en caso de sobrevivir, producen abortos, o lechones enfermos o débiles al nacer, los cuales sucumben en un corto período después de nacer. La infección de las cerdas por "cepas" de baja virulencia generalmente pasa desapercibida, la progenie pueden lucir saludablemente, sin embargo pueden estar sufriendo una infección congénita, con tolerancia inmunológica, eliminando una gran cantidad de virus, pasando semanas o meses sin poder detectarlo. (Terpstra, 1988).

1.4. ASPECTOS DE CONTROL RESPECTO A LA EPIZOOTIOLOGÍA DE LAS DIFERENTES "CEPAS" DEL VIRUS DE LA FPC.

Las medidas de control adoptadas, también influyen grandemente la epizootiología de la enfermedad. Cerrando los mercados para tratar de controlar la diseminación del virus, eliminando los focos de infección, medidas que necesariamente tendrán que ser apoyadas por policías veterinarios y normas zoonosanitarias. Estas medidas han sido exitosas para la eliminación de la enfermedad en algunos países tales como: Escandinavia, Irlanda, Reino Unido, Suiza, Australia, Canadá y EUA. En varios países de Europa del este y oeste, Japón y el Estado de Singapur en donde las áreas de producción son granjas de producción intensiva, las medidas mencionadas han mostrado ser adecuadas.

Consecuentemente la vacunación ha sido aplicada en gran escala, como ayuda para eliminar la enfermedad o reducir el número de brotes, hasta un nivel en el que podría ser factible la erradicación por medidas sanitarias (Van Bekkum, 1976). Aunque las vacunas vivas modificadas, no producen efectos colaterales (Oláh, y Palatka 1969; Sasahara *et al*, 1969) bajo ciertas condiciones, éstas si pueden tener influencia no esperada sobre la epizootiología de la FPC. La vacunación de cerdos infectados inaparentemente puede permitir la distribución del virus iniciando un brote en la piara (Terpstra y Robijns, 1977).

Por otro lado los animales vacunados con vacunas de potencia insuficiente pueden desarrollar una infección subclínica, cuando se exponen a las "cepas" de campo del virus de la FPC; mientras que las cerdas gestantes pueden transmitir el virus en forma horizontal y por vía placentaria (Leunen y Strobbe, 1977). Además la camada procedente de las cerdas vacunadas está protegida por un período largo contra una infección letal, durante las primeras semanas de vida, pero no contra la multiplicación y excreción del virus (Leunen y Strobbe, 1977). Cada cerdo puede experimentar una infección subclínica invariablemente ante una cepa de alta virulencia (Biront, 1983).

Experiencias europeas nos informan que el virus de la FPC puede ser erradicado de áreas enzoóticas, si existe un régimen estricto y sistemático de vacunación, apoyado por policías veterinarios y medidas estrictas zoo-sanitarias y si se continua por largo tiempo (Terpstra, 1977; Terpstra, 1982). Contrariamente, los programas de la Comunidad Económica Europea para la erradicación de la FPC han demostrado que en regiones con un sistema de vacunación incompleto y no sistemático, apoyado de medidas suplementarias, el número de brotes han comenzado a aumentar. El efecto verdadero de la vacunación, tiende a ser fuertemente vigilado por la autoridades veterinarias nacionales e internacionales responsables de las enfermedades notificables y de las zonas de control (Terpstra, 1988).

1.5. IMPORTANCIA DEL DIAGNOSTICO SEROLOGICO.

El diagnóstico serológico de la FPC es una herramienta útil que permite evaluar fallas en la vacunación, además permite detectar animales con la enfermedad subclínica (cerdos infectados asintomáticos), mediante la determinación los perfiles serológicos, o bien para utilizarla como un sistema de vigilancia epizootológica, diagnóstico necesario para la última fase en la Campaña de Erradicación. Algunas pruebas están disponibles para la detección de anticuerpos contra la FPC, tal es la prueba de neutralización viral que es específica para diferenciar anticuerpos entre FPC y Diarrea Viral Bovina; otro ensayo de neutralización unida a peroxidasa ha dado buenos resultados.

En la actualidad no se cuenta con una técnica serológica práctica y rápida que permita a los veterinarios de campo diagnosticar la FPC y mucho menos para poder diferenciar entre la presencia de animales con anticuerpos producidos por virus de campo patógenos, anticuerpos vacunales; debido primordialmente a que las vacunas preparadas con "cepas" vivas atenuadas y además los virus de campo con "cepas" de baja virulencia, pueden estimular títulos de anticuerpos que pueden persistir algunas veces durante toda la vida económica del animal. (Terpstra, 1988).

2.1. OBJETIVOS PARTICULARES

Estudiar las diferencias entre las "cepas" de campo, de referencia y vacunales, del Virus de la FPC, mediante su comportamiento en cultivo primario y titulación en la línea celular PK-15.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

Se trabajó con 17 "cepas" del Virus de la FPC de diferentes orígenes. Se adquirieron 5 "cepas" vacunales (China, Minnesota, GP, PAV-1, PAV-250), tres "cepas" de referencia (Lederle, ALD y Ames), donadas amablemente por los Drs. Arturo Campomanes y Antonio Madrid del Laboratorio de Sanidad Animal-SAGAR, Santa Ana Tecamac, y la cepa AMES donada por el Dr. Pablo Correa-Girón del Laboratorio de Virología del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Veterinaria (CENID-MV, INIFAP, SAGAR); también se trabajaron 9 "cepas" de campo (VC-91-039, VC-89-95; VC-89-95; VC-89-55; VC-90-1591; VC-89-126; VC-90-197; VC-90-1234), que también fueron donadas amablemente por el Dr. Pablo Correa Girón, estos datos se pueden observar en el Cuadro 1.

CUADRO 1.- ORIGEN DE LAS "CEPAS" ESTUDIADAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE PORCINA CLASICA

CEPAS	PROCEDENCIA
REFERENCIA	
ALD	CENASA-SARH ¹
LADERLE	CENASA-SARH ¹
AMES	INIFAP-SAGAR ²
VACUNALES	
MINNESOTA	ANCHOR ³
GP	PRONABIVE ³
CHINA	SINTEX ³
PAV-1	HOESCHST ³
PAV-250	SANFER ³
CAMPO	INIFAP-SARH ²
VC-91-039	"
VC-89-95	"
VC-89-102	"
VC-89-95	"
VC-89-55	"
VC-90-1591	"
VC-89-126	"
VC-90-123	"

¹ CENTRO NACIONAL DE SANIDAD ANIMAL-SARH² INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES Y AGROPECUARIA-CENID-MV-SAGAR³ LABORATORIOS COMERCIALES, PRODUCTORES Y DISTRIBUIDORES DE PRODUCTOS BIOLÓGICOS VETERINARIOS

3.2. CULTIVO EN LA LINEA CELULAR (PK-15)

La diez y siete "cepas" virales se inocularon, cada una por separado, en la línea celular PK-15 (donada por el NVSL de Ames, Iowa, EUA), las cuáles fueron alimentadas con Medio Mínimo Esencial, adicionado de Suero Fetal Bovino libre del DVB y se cosecharon después de 4 días de incubación; la cosecha consistió en romper las células por medio de congelación y descongelación, procedimiento que se realizó tres veces (Wenvoort *et al.*, 1988).

3.3. PRODUCCION DE LAS "SEMILLA" EN CULTIVOS PRIMARIOS DE MÉDULA OSEA.

Se adquirieron dos cerdos SPF (Mendoza *et al.*, 1989), los cuales fueron observados clínicamente durante tres días; posteriormente se sacrificaron y con sus órganos linfoides se hizo un cultivo primario de células no clasificadas; las 17 "cepas" se inocularon por separado, en esta suspensión celular y se incubaron durante 4 a 5 días; posteriormente se cosecharon, se congelaron y se liofilizaron, cada una por separado.

3.4. DETERMINACION DE PROTEINAS

A partir de los viales liofilizados (considerado como "semilla"), cada una de las 17 "cepas", se hidrató con un volumen de 5 ml de agua desionizada estéril, se les determinó la concentración de proteínas, por el Método de Bradford, (Bradford, 1976).

3.5. TECNICA DE INMUNOFLOUORESCENCIA y TITULACION

Las 17 "cepas" del virus de la FPC fueron identificadas por el Método de Inmunofluorescencia directa y tituladas por el Método de Reed y Muench (FAO, 1993).

4. RESULTADOS

La determinación proteica y titulación por inmunofluorescencia directa (IFD) de cada "cepa", se muestra en el Cuadro 2, en el que puede observar que el rango de la concentración de proteínas fluctuó en las diferentes "cepas", en el caso de las vacunales varió entre 82.00 y 87.40 $\mu\text{g/ml}$, en las "cepas" de referencia osciló entre 86.8 y 88.41 $\mu\text{g/ml}$, mientras que en las "cepas" de campo fué de 83.37 a 88.74 $\mu\text{g/ml}$. El medio de cultivo, utilizado como control presentó una concentración de 79 $\mu\text{g/ml}$. Los títulos por IFD, mostraron gran viabilidad entre todas las "cepas", ya que fluctuaron de $10^{1.7567}$ a $10^{7.5405}$; las "cepas" vacunales estuvieron en un rango de $10^{5.1536}$ hasta $10^{6.5500}$; las "cepas" de referencia estuvieron en un rango de $10^{6.2374}$ hasta $10^{7.5405}$ y las "cepas" de campo de $10^{1.7567}$, hasta $10^{4.8446}$. Es importante resaltar que las "cepas" de referencia, vacunales y de campo, mostraron diferencias entre ellas. La determinación de proteínas por el Método de Bradford, de las "cepas" vacunales, las de referencias, y a las de campo; calculó restando el valor de la concentración de proteínas existente en el medio de cultivo.

Los títulos que se obtuvieron por el Método de IFD, fueron determinados por Reed y Muench, para cada una de las "cepas" vacunales, de referencia y de campo.

En la Figura 1 se muestran los resultados obtenidos al realizar la determinación de proteínas a las diferentes "cepas" del virus de la FPC. En la Figura 2 se muestran los resultados de la titulación por IFD realizada a todas las "cepas" del VFPC.

CUADRO 2.- DETERMINACION DE PROTEINAS Y TITULO POR INMUNOFLOURESCENCIA DE CADA UNA DE LAS CEPAS ESTUDIADAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE PORCINA CLASICA .

CEPAS	DETERMINACION DE PROTEINAS (µg/ml)	TITULO POR REED & MUENCH LogBASE 10.	RANGO LogBase 10
REFERENCIA			
ALD	5.36	6.2374	6.2374
LADERLE	9.41	6.8460	A
AMES	9.07	7.5405	7.540
VACUNALES			
MINNESOTA	3.36	6.5500	5.1336
GP	8.06	5.1536	
CHINA	3.36	5.1561	A
PAV-1	8.40	5.5500	
PAV-250	5.04	5.4052	6.5500
CAMPO			
VC-91-039	7.39	3.6716	1.7567
VC-90-039	6.05	3.500	
VC-89-102	4.37	3.3100	
VC-89-95	6.05	3.3048	A
VC-89-55	6.05	3.1248	
VC-90-1591	4.37	2.5945	
VC-89-126	9.74	4.8486	
VC-90-127	7.05	1.7567	4.8486

FIGURA 1 DETERMINACION DE PROTEINAS DE LAS DIFERENTES "CEPAS" DEL VIRUS DE LA FIEBRE PORCINA CLASICA

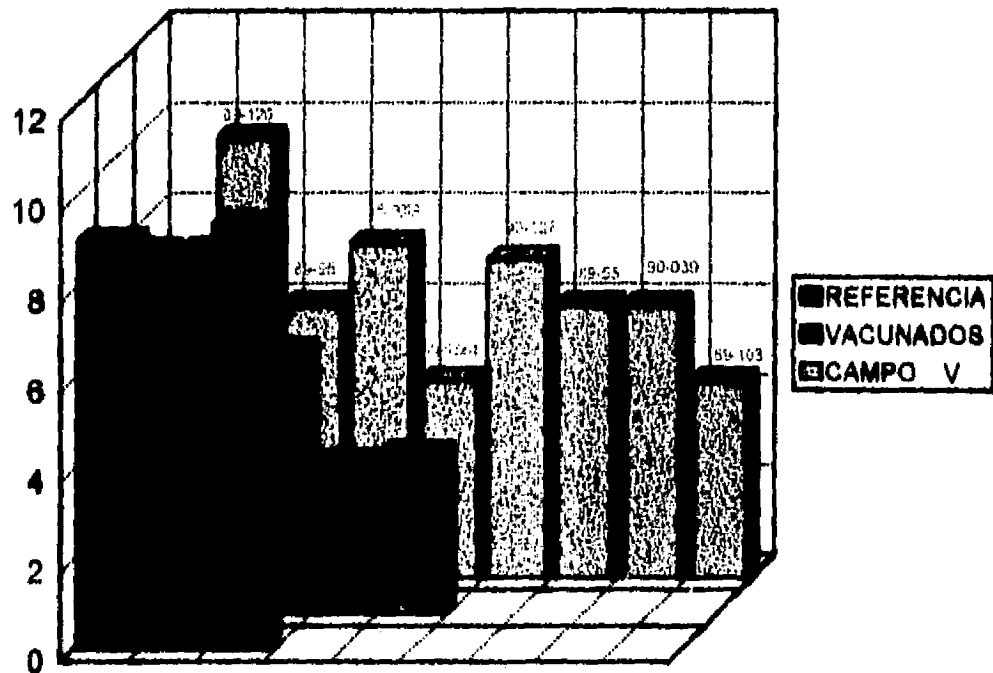


FIGURA 2 TITULACION POR INMUNOFLORESCENCIA DIRECTA DE LAS DIFERENTES "CEPAS" DEL VIRUS DE LA FIEBRE PORCINA CLASICA



FALLA DE ORIGEN

6. DISCUSION

El crecimiento de todas las "cepas" (17 en total), en la suspensión celular de tejido linfoide (cultivo primario con células no clasificadas), fué similar, como lo demuestra la concentración de proteínas. En cuanto a los títulos obtenidos por inmunofluorescencia se observa claramente que las "cepas" de referencias Ames, Lederle y ALD tuvieron títulos más altos, con respecto a las "cepas" vacunales y de campo, como era de esperarse por ser altamente virulentas y adaptadas a los cultivos celulares de la línea PK-15; las "cepas" vacunales tuvieron títulos muy similares; sin embargo, con las "cepas" de campo se encontraron títulos muy variables (altos, moderados y bajos), por lo que probablemente estamos frente a "cepas" con diferentes grados de patogenicidad, lo cual ya ha sido reportado por Terpstra, 1988.

Las "cepas" de campo que fueron proporcionadas por el Dr. Pablo Correa-Girón del Laboratorio de Virología del CENID-MV-INIFAP, e identificadas como VC-91-039, VC-90-039, VC-89-102; VC-89-95; VC-89-55; VC-90-1591; VC-89-126; VC-90-127, mostraron baja virulencia, muy probablemente debio a que son "cepas" aisladas de cerdos y que también ha sido afectados en condiciones de campo, congeladas desde 1989-1990.

La Figura 1, se muestra en forma comparativa la determinación de proteínas de las diferentes "cepas" del virus de la FPC, donde observamos que las "cepas" de campo son las que presentan concentraciones más bajas ya que muy probablemente como son "cepas" adaptadas al cerdo, tuvieron dificultad para crecer a altos títulos en los cultivos celulares de la línea celular PK-15; esta concentración fué mayor en las "cepas" vacunales, sin embargo se presentó una cepa de campo con una concentración alta de proteínas muy similar a las de referencia; muy probablemente esta cepa era más virulenta, que las deás de campo estudiadas. Las "cepas" de

referencia fueron las que tuvieron una concentración más alta de proteínas ya que son "cepas" adaptadas a cultivos celulares. Las "cepas" vacunales crecieron bien como lo demuestra sus concentraciones a excepción de la cepa China que no está adaptada a cultivos celulares, sino a conejos; y esto se demuestra en su concentración de proteínas; sin embargo la "cepa" GP^r, adaptada a cultivos de células de fiñón de cuye (Sasahara, et al, 1969), mostró títulos altos de proteínas y de títulos. Esto se logro confirmar con los títulos de Inmunofluorescencia Directa que se observa también de forma comparativa en la Figura 2, donde observamos que los títulos más altos correspondieron a las "cepas" de referencia que son las más virulentas; después en forma decreciente están las vacunales que por estar adaptadas a dichos cultivos, tuvieron un buen crecimiento, a excepción de la cepa China, y por último las de campo, que como ya se mencionó se encuentran adaptadas al cerdo y no a los cultivos celulares. En la determinación proteica se encontró que la concentración de proteínas fluctó en las "cepas" vacunales entre 82.00 y 87.40 µg/ml; en las "cepas" de referencia entre 86.8 y 88.41 µg/ml; mientras que en las "cepas" de campo 83.37 y 88.74 µg/ml. El medio de cultivo presento una concentración 79 µg/ml. Los resultados de los títulos por IFD, mostraron que las "cepas" vacunales estuvieron en un rango de $10^{5.1536}$ hasta $10^{6.5500}$; las "cepas" de referencia estuvieron en un rango de $10^{6.2374}$ hasta $10^{7.5405}$ y las "cepas" de campo de $10^{1.7567}$, hasta $10^{4.8446}$. Las "cepas" de campo tuvieron un comportamiento muy variable lo que se sugiere que existen "cepas" de diferente grado de patogenicidad.

7. BIBLIOGRAFIA

Biront, P. Leunen J, Depierreux R., Vandavelde A, Pastoret P.P., Dewaele A (1983): La peste porcine classique, diagnostic, transmission et prphylaxie. Ann Med Vet (127):547-563.

Bradford, M.N., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microquantities of protein. Anal. Biochem.72, pp.248.

Comité en Fiebre Porcina Clásica. 1994 "Fiebre Porcina Clasica" Investigaciones Actuales: Necesidades y Perspectivas para el diagnóstico. Memorias de la tercera reunión anual del Consejo Tecnico Consultivo Nacional de Sanidad Animal, pp 222.

FAO, 1993. Aislamiento Viral e Inmuofluorescencia. Manual de Técnicas de Diagnóstico Viroológico. Red de Cooperación Técnica. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, pp. 12-44.

Kamolsiriprichaiporn, S., Morrissy,C.J. and Westbury, H., 1992. A comparison of the pathogenicity of two strains of hog cholera virus. 2 Virological Studies. Australian Veterinary Journal 69:10, pp 245-248.

Kresse, B.S., Stewart, W., Carbrey, E., Snyder, B., 1976. Sensitivity of swine buffy coat culture to infection with Hog Cholera Virus. Am J. Vet. Res. Vol. 37 No. 11, pp.1315-1318.

Launis, M. Aynaud, J.M., Corthier G., 1972. Peste porcine classique:Propriétés d'un clone (souche Thiverval) isolé en culture cellulaire á basse temperature. Application dans la vaccination. Rev Med Vét (123):1537-1554.

Leunen, J, Strobbe, R., 1977. Capacity of attenuated swine fever vaccines to prevent virus carriers in the vaccinated pigs after contact with field virus. Arch Exp. Vet. Med (31):533-537.

Liess B, Röder, B., Eife K, Hirschert, K, Berger J, Bachamann, C., 1975. Untersuchungen über die Europäische Schweinwenepest. V. Ermittlung inapparent infizierten Schweine in der Ferkelerzeugenenbeständen in drei Ortschaften. Berl Munch Tierärztl Wschr (88)397-409.

Mendoza, E.S., Correa, G.P., Hernández, B.E., y Ciprián, A.C., 1992. Perspectiva de un Método de diagnóstico serológico rápido para la FPC. XXVII Congreso Nacional AMVEC, Acapulco, Gro. pp. 54.

Mendoza, E.S., Correa, G.P., Ayala, G., Hernández, B.E. y Ciprián, A.C., 1994. Biological differences among field reference and vaccinal strains of hog cholerae virus. Proc. Int. Pig. Vet. Congr, Bangkok, Thailandia, pp. 83.

Nettles, V., Com, J., Erickson, G., and Jessup, D., 1989. A survey of wild swine in the United States for evidence of hog cholera. Journal of Wildlife Diseases 25(1) pp61-65.

Oláh P., Palatka, Z., 1967. Immunobiological study of lapinized Hog Cholera virus strains. Acta Vet. Acad Sci Hung (17), pp239-247.

Rovozzo, G., Burke, C. 1973. A Manual of Basic Virological Techniques. Prentice Hall. PP.38-62.

Sasahara, J., Kumagai, T., Shimizu, Y., Furuuchi S., 1969. Field experiments of Hog Cholera live vaccine prepared in guinea pig kidney. Nat Inst Anim Health Quart (9):83-91

Terpstra, C, Robijns K.G., 1977. Experience with regional vaccination against Swine Fever in enzootic areas for limited periods using C-strain virus. Arch Exp. Vet. Med. (31):533-576

Terpstra, C., 1977. The immunity against challenge with Swine Fever virus of piglets from sows vaccinated with C-strain virus. Tijdschr Diergeneesk (102):1293-1298.

Terpstra, C., 1982. Control of Swine Fever in enzootic areas by regional vaccination for limited periods using C-strain virus. Proc. Int. Pig. Vet. Congr, Mexico City (7):127.

Terpstra, C; Bloemradd, M. and Gielkens, A.L.(1984). The neutralizing peroxidasa-linked assay for detection of monoclonal antibodies.in Epitopes on structural proteins of Hog Cholerae (Swine Fever) virus. Vet Microbiol 9: 113-120.

Terpstra, C., 1988. Epizootiology of Hog Cholera. Liess, B: Classical Swine fever and Related Viral Infections. Martinius Nijhorff Publishing, Boston, pp 201-216.

Van Bekkum, J.G., 1976. Impact control programs on the epizootiology of the disease in the field. In: CEC seminar on "Diagnosis and epizootiology of classical Swine Fever". Amsterdam, EUR 5486, pp. 211-229.

Wensvoort, G. Terpstra, C., Boonstra, J., Bloemraad, M. and Van Zaane, D., 1986. Production of monoclonal antibodies against Swine Fever virus and their use in laboratory diagnosis. Veterinary Microbiology 17, 129-140.

Wensvoort, G., Bloemraad M y Terpstra C., 1988. An Enzyme Immunoassay emploting monoclonal antibodies and detecting specifically antibodies to Classical Swine Fever virus. Veterinary Microbiology, 17: 129-140.

Wensvoort, G. y Terpstra, C., 1988. Bovine viral diarrhoea virus infections in piglets born to sows vaccinated against swine fever with contaminated vaccine. Research in Veterinary Science 45, pp 143-148.

Wensvoort, G., 1989. Epitopes on structural proteins of Hog Cholera (Swine Fever) virus. Thesis doctor. Utrech, March.

Wensvoort, G., Terpstra, C., Kluyver, E.P., Kragten, C. and Warnaar, J.C., 1989. Characterization of pestivirus strains with monoclonal against Hog Cholera Virus in Epitopes on structural proteins of Hog Cholerae (Swine Fever) virus. Thesis. p. 41-50.

Wood, L., Brockman, S., Harkness, J., Edwards, S., 1988. Classical Swine Fever: Virulence and tissue distribution of a 1986 English isolate in pigs. Veterinary Record, 122. pp. 391-394.

CAPITULO 2

TIPIFICACION DE "CEPAS" DE LA FIEBRE PORCINA CLASICA AISLADAS DE VARIOS PAISES Y DE CEPAS AISLADAS EN MEXICO MEDIANTE ANTICUERPOS MONOCLONALES.

RESUMEN

Se trabajaron varias "cepas" del virus de la FPC de diversos países (A=alta virulencia; M=mediana virulencia y B=baja virulencia (vacunales), utilizando anticuerpos monoclonales (del 2 al 13) dirigidos hacia las glicoproteínas E1 y E2 de la envoltura viral. Las "cepas" procedían de varios países y fueron las siguientes: **ALEMANIA:** cepa Behring (A); **E.U.A.:** cepa Bai (A), cepa Cornell (A), cepa AMES, cepa 331 (M) y cepa PAV-250 (B); **FRANCIA:** cepa ALFORT (A), cepa ALFORT 2.3.1 (M) y cepa ALFORT 2.3.2 (M); **JAPON:** cepa New Lederle (A) y cepa ALD (A); **HOLANDA:** cepa Brescia 2.1.1 (A), cepa Baker A 1.2.1 (A), cepa Henken (B), cepa Cedipest (B) y las "cepas" de campo Jongen y Wild Boar; y finalmente las "cepas" de **POLONIA** que fueron de campo: Spruit 2 y Jongerbreur. Al analizar el determinante antigénico revelado con el monoclonal 12, presente en el grupo A (A3), éste no se encontró en las "cepas" de **ALEMANIA, FRANCIA, HOLANDA** y Polonia ("cepas" europeas), el AcM 12 también da positivo con los AcM 2 y a veces con los AcM 3, 4 y 7 y no con los AcM 9, 10 y 11 lo que se muestra solo el sitio neutralizante en el grupo A, no importando si la cepa es de alta, mediana, baja virulencia o de campo. Con respecto al AcM 6 que pertenece al grupo B no se encontró en todas las "cepas" (excepto en las polacas), también no importando su virulencia, en el caso de la cepa vacunal PAV-250 no se encontró reacción a este AcM, sitio que es neutralizante. Los AcM del grupo C como son el 1, 5 y 8, muestran que son anticuerpos que reconocen sitios neutralizantes de la glicoproteína; el AcM 5 no reaccionó en las "cepas" tanto europeas, japonesas como americanas, no importando su virulencia, solo una cepa si reconoció ese determinante antigénico y fue la PAV-250; con respecto al otro sitio del grupo C que fue el 8, no lo tuvieron las "cepas" de Alemania, Francia, Japón y algunas de EUA y fueron "cepas" de alta, mediana y baja patogenicidad; las "cepas" de Polonia y Holanda y algunas de EUA de baja virulencia y de campo si presentaron dicho determinante antigénico.

Se analizaron varias "cepas" del virus de la FPC aisladas en México, que se identificaron como A=alta virulencia; M=mediana virulencia y B=baja virulencia, y fueron los siguientes: Cepa China (B), cepa Minnesota (B), cepa PAV-1 S (B), cepa Minnesota-P (B), cepa PAV-250-P; "cepas" controles: de **ALEMANIA:** cepa Behring (A); **E.U.A.:** cepa Cornell (A), cepa AMES (M) y cepa PAV-250 (B); **FRANCIA:** cepa ALFORT (A); **JAPON:** cepa ALD (A); **HOLANDA:** cepa Brescia 2.1.1 (A). Los virus fueron cultivados en las líneas celulares PK-15 y SK-6 que posteriormente fueron sembradas en placas de microtitulación. Las células/virus se fijaron y se les adicionaron los monoclonales (desde el 2 hasta el 13) y se incubaron, las placas se lavaron, y se les realizó la prueba de inmunoperoxidasa. **MEXICO:**

cepa China: 5, 6, 13, cepa Minnesota: 5, 6, 8, 8(W) y 13, cepa PAV-1 S: 5, 6, 8, 13 (W) cepa Minnesota-P: 5, 6, 8 y 13 (W), cepa PAV-250-P: 6 y las "cepas" de campo: 4-P: 5, 6 y 8; 5-P: 5 y 6; 11-S: 5, 6 y 12 y 13-S: 5, 6 y 12. El análisis del determinante antigénico revelado con el monoclonal 12 presente en el grupo A (A3) no se encontró en dos "cepas" de campo mexicanas. Con respecto al AcM 6 que pertenece al grupo B no se encontró en todas las "cepas", también no importando su virulencia, en el caso de la cepa vacunal PAV-250 no se encontró reacción a este AcM, sitio que es neutralizante. Los AcM del grupo C como son el 1, 5 y 8, mostraron que son anticuerpos que reconocen sitios neutralizantes de la glicoproteína; el AcM 5 no reaccionó en las "cepas" aisladas en México y también no importando su virulencia, solo una cepa si reconoció ese determinante antigénico fue la PAV-250; con respecto al otro sitio del grupo C que fue el 8, no lo tuvieron las "cepas" de Alemania, Francia, Japón y algunas de EUA y México y fueron "cepas" de alta, mediana y baja patogenicidad.

SUMMARY

Hog cholerae virus "strain" were used with high (H), medium (M) and vaccines (V) with no virulence; the vaccines used were: China (V), PAV-1 (V), Minnesota (V), and PAV-250 (V). Virulent virus "strain" were: Germany, Behring strain (H); USA., Cornell (M), Ames (H) "strain"; France, Alfort (H) strain; Japan, ALD (H) strain; and Holland, Brescia 2.1.1. (H) strain, field "strain": 4P; 5P; 11S and 13S. All viruses were cultured in PK-15 and SK-6 cell lines, and then seeded onto microtitration plates. Infected cells were fixed and incubated with Monoclonal Antibodies (Mab's) (number 2 to 13), plates were washed and peroxidase test was performed. Results of reactions were: Mexico, China "strain": 5, 6 and 13; Minnesota "strain": 5, 6, 8 and 13 (W); PAV-1 "strain" 5,6, 8, 13 (W); PAV-250: 6; and field "strain" 4P: 5,6 and 8; 5P: 5 and 6; 11S: 5, 6 and 12; and 13S: 5, 6 and 12. Analysis of the antigenic determinant revealed with Mab 12 present in A group (A3) was not found in two of four Mexican field "strain". Mab 6 that recognizes the neutralization site. Mab's 1, 5 and 8 (C group) showed that recognize neutralizing sites of the glycoprotein; Mab 5 had no reaction with field Mexican "strain". Mab A (the other site of group C), had no reaction with "strain" from Germany, France, Japan, and some from USA and Mexico, and were "strain" with high, medium and no pathogenicity.

Hog cholerae "strain" were used with high (H), medium (M), low virulence (L); and non virulent vaccines (V) from different countries were typed using Monoclonal antibodies (Mab's) (from number 2 to 13) directed to glycoproteins E1 and E2 of the viral envelope. The studied "strain" were from: Germany, Behring strain (H); USA., Bai (H), Cornell (M), Ames, 331 (H) and PAV-250 (V) "strain"; France, Alfort (H) Alfort 2.3.1 (M) and Alfort 2.3.2 (M) "strain"; Japan, New Lederle (H) ALD (H) "strain"; Holland, Brescia 2.1.1., Baker A 1.2.1 (H) strain, Henken (L) Cedipest (L) "strain" field "strain" Jongen and Wild boar; and finally field "strain" from Polland Spruit 2 and Jongerbreuer. Analysis of the antigenic determinant detected with Mab 12 (A group) (A3) was not present in the "strain" from Germany, France, Holland and Polland; also had reaction with Mab 2 and sometimes with Mab's 3,4 and 7 and not with Mab's 9, 10 and 11, showed only in virulence or origin. Reaction to Mab 6 (B group), was found only in Polland "strain", without influence of virulence level. In the case of PAV-250 strain, there was no reaction with Mab 6, that recognizes the neutralizing site. Mab's 1,5 and 8 (C group) showed that are antibodies which recognize neutralizing sites of the glycoprotein. Mab 6 reacted only with PAV-250 strain. With respect to Mab 8 (C group), it reacted only with some of the American "strain". The "strain" from Holland and Polland and some from USA of low virulence, and field "strain" showed reactions to this antigenic determinant.

1. INTRODUCCION

La FPC, es una enfermedad altamente contagiosa, que afecta al sistema nervioso, endotelios vasculares y células reticuloendoteliales. Se caracteriza por la presencia de hemorragias generalizadas e infartos en los órganos internos. Algunas pruebas de laboratorio están disponibles para la detección de anticuerpos contra la FPC, tal es la prueba de neutralización viral, que es específica para diferenciar anticuerpos entre FPC y Diarrea Viral Bovina; otro ensayo de neutralización unida, a peroxidasa, ha dado buenos resultados. El diagnóstico serológico de la FPC es una herramienta útil que permite evaluar fallas en la vacunación, además permite evaluar animales que procedieron de la enfermedad subclínica (cerdos infectados asintomáticos y que se recuperaron), mediante la obtención de los perfiles serológicos, o bien para utilizar esta prueba como un sistema de vigilancia epizootiológica, diagnóstico necesario para la última fase de la Campaña de Erradicación. En la actualidad no se cuenta con una técnica serológica práctica y rápida que permita a los veterinarios de campo diagnosticar la FPC y mucho menos que se pueda diferenciar entre aquellos animales que tienen anticuerpos vacunales y los que desarrollan anticuerpos a causa de la infección por virus de campo patógenos.

Al virus de la FPC se le han encontrado tres proteínas estructurales en su envoltura viral. Dos de ellas son glicoproteínas y se denominan: E1 ó gp 55 (55,000 d) y E2 ó gp 46 (46,000 d); y la tercera, que no es glicosilada, denominada C ó p 36 (36,000 d). Las investigaciones realizadas con anticuerpos monoclonales (AcM) hacia las glicoproteínas E1 y E2 han mostrado que existen trece determinantes antigénicos, conocidos con números arábigos (1, 2, 3, etc.) y que se han integrado en cuatro grupos: A, B, C y D. En los Grupos B y C se encuentran los anticuerpos monoclonales hacia los sitios neutralizantes; en el Grupo A, Subgrupo A2 se encuentre los anticuerpos monoclonales hacia el sitio conservado; mientras que el Subgrupo A1 se encuentran los anticuerpos monoclonales hacia ambos sitios; los anticuerpos monoclonales del Grupo D, no muestran ninguna actividad. Se ha encontrado sinergismo entre los determinantes antigénicos de los Grupos A y B y entre los Grupos A y C; no se ha encontrado entre los grupos A y D; B y D; y C y D. Esto se demuestra en los Diagramas 1 y 2.

DIAGRAMA 1. Grupos de epitopes dominantes determinados por el Ensayo de Captura de Antígeno (ECA). Estos epitopes se encuentran en la misma proteína distante. Un resultado negativo al ECA es indicativo de que los epitopes fueron adyacentes o espaciados (Esquina). Los epitopes fueron agrupados en cuatro dominios A, B, C, D, con dominios en A de AcMs del 1-12.

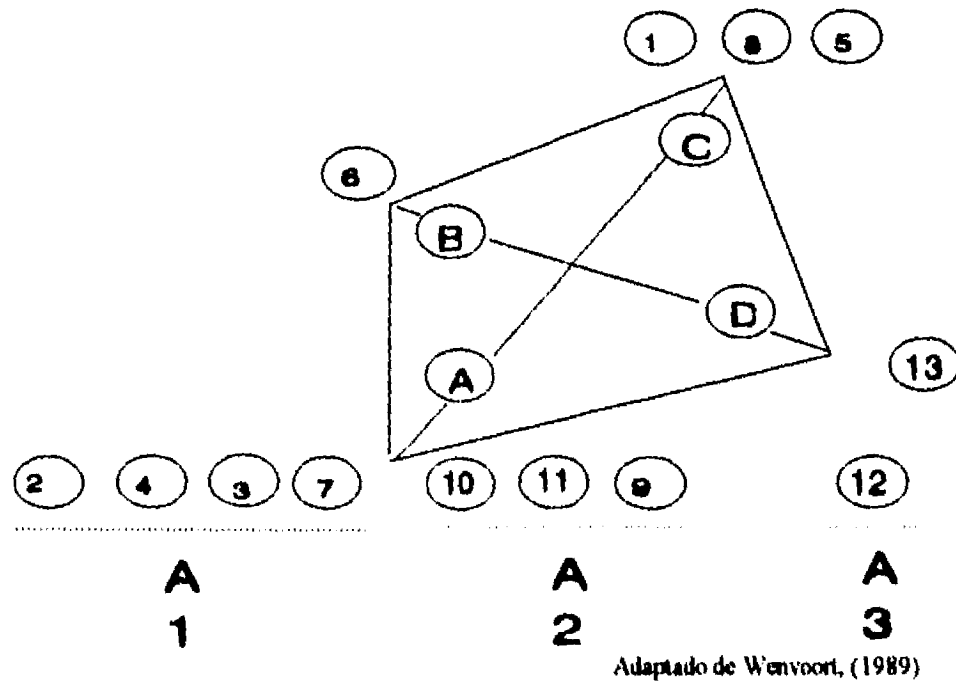
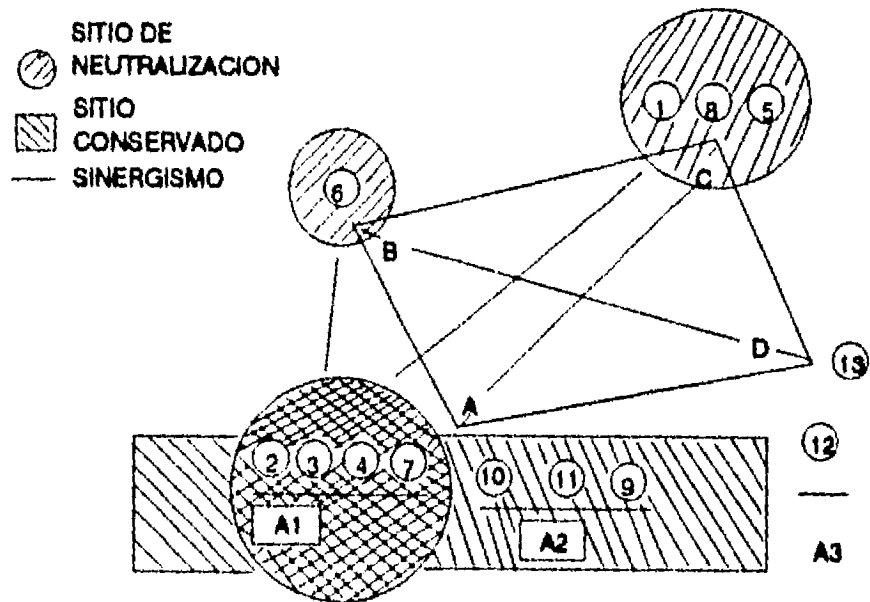


DIAGRAMA 2. Analisis Topográfico y Funcional de los 13 AcMs de la cepa Brescia del VFPC.



Weiland *et al* (1990), obtuvieron ocho anticuerpos monoclonales que fueron preparados a partir de la "cepa" Alfort 187, estos fueron enfrentados contra 14 "cepas" del VFPC; pero estos monoclonales sólo reaccionaron con 7 "cepas" del VFPC, lo que demostró que los AcM fueron dirigidos contra epítopes conservados, la positividad a las otras 5 "cepas" demostraron que existen anticuerpos neutralizantes homólogos a la cepa, dando una reacción cruzada. Estos anticuerpos monoclonales (AcMs), por inmunoprecipitación, demostraron que fueron preparados y dirigidos contra la glicoproteína mayor E1 de la envoltura, en forma de doblete (56-60 Kd). Otro panel de AcMs fueron preparados y utilizados en cortes de tejidos infectados con el VFPC y estos fueron teñidos con la técnica de Inmunofluorescencia Directa y con la Indirecta, utilizando el sistema de Biotina/Avidina, resultando altamente específicas y sin reacciones cruzadas (Zhou *et al*, 1989). Por otro lado un panel de 30 AcMs fueron definidos y caracterizados con respecto a su capacidad de unión, en la prueba de inmunoperoxidasa, a diferentes "cepas" de pestivirus. Usando este panel fue posible identificar específicamente "cepas" y aislamientos del virus, vacunas para la FPC derivadas de la cepa "C" y "cepas" de DVB y de Border Disease (BD). Una pequeña proporción de aislamientos de DVB/ y de BD de cerdos y de rumiantes reaccionaron únicamente a monoclonales específicos del antígeno de grupo de los pestivirus. Por lo que los organismos oficiales han recomendado que los AcMs deberán ser usados como métodos de tipificación (Edwards *et al*, 1991).

La última diferenciación que se debe hacer entre el VFPC y DVB está basada en estudios con Anticuerpos Monoclonales (AcMs). La diferencia reciente entre estos virus ha sido facilitada por la tipificación de aislamientos, utilizando AcMs, (Terpstra y Wenvoort, 1988).

2. OBJETIVOS PARTICULARES

2.1. Identificar las "cepas" del VFPC y diferenciarlas del virus de la Diarrea Viral Bovina (DVB), mediante la técnica de Inmunoperoxidasa con anticuerpos monoclonales.

2.2. Encontrar diferencias entre las "cepas" del VFPC de campo, vacunales y de referencia de varias partes del mundo, mediante el empleo de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la glicoproteína de la envoltura viral.

2.3. Determinar las diferencias de patogenicidad de las diversas "cepas" del VFPC, mediante la técnica de tipificación con anticuerpos monoclonales y por titulación.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Laboratorio donde se realizaron los estudios

Laboratorio de Virología del Central Veterinary Institute (CDI-DLO) localizado, en Lelystad, Holanda, y en el Laboratorio de Virología de la FES-C-UNAM.

3.2. "Cepas"

Se trabajaron varias "cepas" del virus de la FPC de diversos países, identificadas como A=alta virulencia; M=mediana virulencia y B=baja (vacunales) virulencia. Se incluyeron además las 17 "cepas" utilizadas en el primer estudio descrito en esta tesis.

3.3.. "Cepas" Y Países.

ALEMANIA: "cepa" Behring (A); **E.U.A.:** "cepa" BAI (A), "cepa" Cornell (A), "cepa" AMES, "cepa" 331 (M) y "cepa" PAV-250 (B); **FRANCIA:** "cepa" ALFORT (A), "cepa" ALFORT 2.3.1 (M) y "cepa" ALFORT 2.3.2 (M); **JAPON:** "cepa" New Lederle (A) y "cepa" ALD (A); **HOLANDA:** "cepa" Brescia 2.1.1 (A), "cepa" Baker A 1.2.1 (A), "cepa" Henken (B), "cepa" Cedipest (B) y las "cepas" de campo Jongen y Wild Boar; **MÉXICO:** "cepa" China (B), "cepa" Minnesota (B), "cepa" PAV-1 S (B), "cepa" Minnesota-P (B), "cepa" PAV-250-P (B) y las "cepas" de campo: 4-P, 5-P, 11-S y 13-S y finalmente las "cepas" de **POLONIA** que fueron de campo: Spruit 2 y Jongerbreur. Estas se pueden observar en el Cuadro 3.

Todas las técnicas que se utilizaron, fueron diseñadas y estandarizadas por el Dr. Tersptra y el Dr. Bloemraad (Bloemraad, 1989).

3.4. Anticuerpos Monoclonales

Los anticuerpos monoclonales utilizados para identificar los epítopes del VFPC fueron los numerados del 2 al 13; en la preparación de los monoclonales mencionados se utilizó la "cepa" Brescia que es una "cepa" holandesa mientras que para la identificación del DVB se utilizaron los monoclonales 12 y 13.

3.5. Cultivo Viral

Todas las "cepas" (31) fueron replicadas en las líneas celulares PK-15 y SK-6 (células de riñón de cerdo), para su posterior identificación, tipificación y titulación. Para ello se colocaron 90 µl de medio de cultivo (Eagle+10% SFB), se inocularon 10 µl de la "cepa" correspondiente de la FPC; se colocaron 50 µl de células (línea celular PK-15 y/o SK-6); se incubó de 3 a 4 días y se lleva a cabo la reacción con los anticuerpos monoclonales.

3.6. Técnica de Inmunofluorescencia

Las "cepas" del VFPC fueron identificadas como pestivirus, mediante la técnica de inmunofluorescencia con un conjugado de VFPC-policlonal. Para realizar esta prueba se colocaron 90 µl de medio de cultivo (Eagle+10% SFB), se depositaron 10 µl de la "cepa" del VFPC; se colocaron 50 µl de la suspensión de células (línea celular PK-15 y/o SK-6); se incubó durante 3 a 4 días, se lavan con amortiguador de fosfatos (PBS); se secan; se fijan en acetona durante 10 minutos, se tiñen con el conjugado de FPC, marcado con isotiocianato de fluoresceína durante 30 mins, a 37 C y en una cámara húmeda, se lavan con PBS, se secan y se montan con glicerol-PBS (1:1) y al realizar la interpretación de la prueba (el citoplasma se teñirá de color verde fluorescente característico).

3.7.. Identificación Viral (FPC) por medio de la prueba de Inmuperoxidasa con anticuerpos monoclonales 3 y 8, preparados con la cepa BRESCIA.

Con el objeto de identificar al VFPC y diferenciarlo del virus de la DVB y del BD, se infectan las monocapas que previamente fueron sembradas en microplacas, con las correspondientes "cepas", se incubaron a 37 C en una estufa con 5 % de CO₂ durante 3 días; posteriormente se lavan y se secan las microplacas; las microplacas con las células previamente inoculadas con el VFPC correspondiente, se fijan a 80 C durante una hora, se lavan, se les adicionaron los 50 µl del

conjugado con los anticuerpos monoclonales 3 y 8 y un monoclonal contra el virus de la DVB y un monoclonal contra el virus de BD; se incubaron a 37 C durante 1 hora; se lavaron las placas; se revelaron con 20 μ l de AEC (3-amino-9 ethyl-carbazole+ 10 μ l de H₂O₂ (30%)), previamente filtrado por un filtro de porosidad de 0.22 μ m; y se interpretaron los resultados con base en los Cuadros 1 y 2.

3.8. Tipificación Viral (FPC) utilizando anticuerpos monoclonales (2-13).

Con el objetivo de tipificar los VFPC empleados en este experimento, se infectan las monocapas que previamente fueron sembradas en microplacas, con las correspondientes "cepas", se incubaron a 37 C en una estufa con 5 % de CO₂ durante 3 días; posteriormente se lavan y se secan las microplacas; las microplacas con las células previamente inoculadas con el VFPC correspondiente, se fijan a 80 C durante una hora, se lavan, se les adicionaron los 50 μ l del conjugado con los anticuerpos monoclonales 3 y 8 y un monoclonal contra el virus de la DVB y un monoclonal contra el virus de BD; se incubaron a 37 C durante 1 hora; se lavaron las placas; se revelaron con 20 μ l de AEC (3-amino-9 ethyl-carbazole+ 10 μ l de H₂O₂ (30%)), previamente filtrado por un filtro de porosidad de 0.22 μ m; y se leyeron los resultados.

3.9. Titulación Viral de las "cepas" del VFPC por medio de anticuerpos monoclonales (2-13).

Se colocaron 20 μ l de medio de cultivo conteniendo células en suspensión, de la línea celular (PK-15 y/o SK-6) en todos los pozos de la microplaca; se colocó una de las "cepas" en estudio en cada fila y se realizaron las diluciones de base 10, se incubaron a 37 C en una estufa con 5% de CO₂ durante 3 días, se lavaron y secaron las microplacas; se les adicionaron 50 μ l del conjugado de los AcMs (3 y 8); se incubaron a 37 C durante 1 hora durante 1 hr; se lavaron las placas; se revelaron con 20 ml de AEC (3-amino-9-ethyl-carbazole)+10 μ l de H₂O₂ (30%), filtrado por un filtro con porosidad de 0.22 μ m; se leyeron los resultados; se utilizó la prueba de Reed and Muench, para obtener el título.

3.9. Interpretación

La interpretación de los resultados de las pruebas de Inmunofluorescencia Directa (IFD) y de Inmunoperoxidasa (IPT), al utilizar los AcMs 3 y 8 se muestra en el cuadro 1. Un resultado positivo a la prueba de IFD con el conjugado policlonal puede ser causado por la presencia del virus de campo de la FPC, Virus vacunal, Virus de la DVB o Enfermedad de la Frontera (BD).

Cuando las "cepas" o muestras resultan positivas a los AcMs 3 y 8 , es porque éstos reconocieron epítopes que siempre están en el VFPC. Cuando las muestras son positivas al AcM 3, el virus en estudio es sospechoso de ser virus vacunal; no así con el AcM 8 que no reconoce al Virus vacunal. Estos dos AcMs descartan en un 100% al virus de la DVB y del virus de BD, resultando ser positivos sólo con la IFD (conjugado policlonal) y con el policlonal peroxidado del VFPC.

Los resultados que se observaron al enfrentar a los 13 AcMs obtenidos de la "cepa" Brescia contra las seis "cepas" en estudio, se interpretó tomando en cuenta que la "cepa" Brescia reaccionó a todos los AcMs reportándose como 0; el resto de las "cepas" que no reaccionaron a los AcMs fueron señalados con el signo(-), por ejemplo (-6).

CUADRO 1. INTERPRETACION DEL DIAGNOSTICO CORRESPONDIENTES A LAS MUESTRAS DE LA FIEBRE PORCINA CLASICA MEDIANTE LA UTILIZACION DE AcMs Y POLICLONALES.

INTERPRETACION				
IFD	IPT (AcMs)			DX
	8	3	P	
+	+	+	+	HCV
+	-	+	+	HCV/VV
+	-	-	+	DVB

IFD= Inmunofluorescencia Directa; IPT= Inmunoperoxidasa; P=Policlonal; AcMs (3 y 8)=Monoclonales; DX=Diagnóstico; VV=Virus vacunal.

CUADRO 2. ANTICUERPOS MONOCLONALES IMPORTANTES PARA LA DIFERENCIACION DEL VFPC.

AcMs	INDICATIVO DE
1	VACUNA
2	CAMPO
3	HCV
4	HCV

AcMs= Anticuerpos monoclonales HCV=HPC

4. RESULTADOS

Los resultados de las 31 "cepas" estudiadas se describen enseguida por país de procedencia o por el lugar que fueron obtenidas, las cuales fueron probadas con el panel de anticuerpos monoclonales de la cepa Brescia del VFPC; estas "cepas" se muestran en el Cuadro 3.

ALEMANIA: "cepa" Behring: negativo a los monoclonales 5, 6, 8 y 12, (lo que significa que el resto de AcM están detectando los determinantes antigénicos: 2, 3, 4, 7, 9, 10, 11 y 12, y que carecen de los epítopes 5, 6, 8 y 12);

E.U.A.: "cepa" Bai: 5, 6 y 8, "cepa" Cornell: 5 y 13, "cepa" Ames: 6 y 8, "cepa" 331: 5, 6 y 13 y "cepa" PAV-250: 6;

FRANCIA: "cepa" Alfort: 5, 6, 8 y 12, "cepa" Alfort (clona) 2.3.1: 5, 6, 8, 12 y "cepa" Alfort (clona) 2.3.2: 5, 6, 8, 12 (d);

JAPON: "cepa" New Lederle: 5(d), 6 y 8 y "cepa" ALD: 5, 6 y 8; GPE: 5, 6, 8 y 12

HOLANDA: "cepa" Bescia (clona) 1.1.1: con todos; "cepa" Brescia (clona) 2.1.1: con todos; "cepa" Baker A 1.2.1: con todos, "cepa" Henken: 5, 6, 12 y 13(d), "cepa" Cedipest: 5, 6 y 13 (d) y las "cepas" de campo Jongen: 5, 6, 12 y 13; y Wild Boar: 5, 12 y 13 (d);

MÉXICO: "cepa" China(C-Su): 5 (d), 6, 13 (d), "cepa" Minnesota: 5, 6, 8, 8(W) y 13, "cepa" PAV-1 S: 5, 6, 8, 13 (W) "cepa" Minnesota-P: 5, 6, 8 y 13 (d), "cepa" PAV-250-P: 6 y las "cepas" de campo: P-4: 5, 6 y 8; P-5: 5 y 6; 89-55: 6 y 8 y 89-126: 6 y 8 y finalmente las "cepas" de;

POLONIA que fueron de campo: Spruit 2: 5 y 12 y Jongerbreur: 5 y 12.

El Cuadro 4 nos muestra los resultados de la 31 "cepas" del VFPC enfrentados a los 13 AcMs preparados con la "cepa" Brescia; podemos observar que los huecos con sombra oscura, corresponde a los AcMs a los que reaccionaron las "cepas", mientras que los huecos blancos son aquellos a los que reaccionaron.

El Cuadro 5. nos muestra los resultados de las 6 "cepas" que fueron seleccionadas en este capítulo, para seguir los estudios que se realizaron en los próximos capítulos.

CUADRO 3. RESULTADO DE LA TIPIFICACION CON ANTICUERPOS MONOCLONALES DE LA CEPA BRESCIA CONTRA DIFERENTES CEPAS DEL VFPC

ANTICUERPOS MONOCLONALES				
CEPA ALTA VIRULENCIA	1er ESTUDIO	2o ESTUDIO	ESTUDIO PRELIMINAR*	PAIS
3- BRESCIA	0	0	0	HOLANDA
7-BAJ	5,6,8	5,6,8	1,5,6,8	USA
8-CORNELL	5,13	5,13		USA
9-BIKERING	5,8,12	5,6,12	1,5,6,8,12	ALEMANIA
11-BRESCIA 1.1.1.	0	0	0	HOLANDA
12- NEW LEDERLE	5,6,8	5,6,8,9	1,5,6,8,12	JAPAN
13-ALFORT	5,6,8,12	5,6,8,12	1,5,6,8,13	FRANCIA
14- AMES	5,6,8,9	5,9	1,5,6,8,12	USA
15- GFE	5,6,12,13	5,6,8,12	1,5,6,8	JAPAN
16-ALD	5,6,8	5,6,8	1,5,6,8	JAPAN
29-BAKER A.1.2.1.0.	0	0	0	
CEPAS DE		MEDIANA		VIRULENCIA
1- ALFORT 2.1.1.	5,6,8,12	5,6,8,12	1,5,6,8,12	FRANCIA
2-ALFORT 2.1.2.	5,6,8,13	5,6,8,12	5,6,8,13	FRANCIA
5-ZOELN	5,12&13d	5,12&13d	5,12,13	HOLANDA
6-311	5,6,13	5,6	5,6,13	USA
CEPAS DE		BAJA		VIRULENCIA
16- PAV-250	6	6	6	MEXICO
4- HENKEN	5,6,12	5,6,12	5,6,8,12	HOLANDA
17-CATRAIN-9	5,6,13	5w,13w		MEXICO
18-MINNESOTA-S	5,6,8d	5,6,8,13d		MEXICO
19-PAV-13	5,6	5,6,8,13d		MEXICO
20-CEDIPEST	0	0	0	HOLANDA
27- MINNESOTA-P-B-IN	5,6,8,13	5,6,8,13		MEXICO
CEPAS DE CAMPO				
21-JONGEN	5,6,12,13	5,6,12,13	5,6,12,13	HOLANDA
22-WILD BOAR	5,12&13d	5,12&13d		HOLANDA
23-P-4		5,6,8		MEXICO
24-P-5		5,6,7		MEXICO
25-09-35		6,8		MEXICO
16-09-126		6,8		MEXICO
28- PAV-250 (C)	6	6	6	MEXICO
30-SPMUT 2		5,12		POLONIA
31-JONGERBREUER		5,12		POLONIA

LA LETRA d = 0000 * = CEPA OBTENIDA POR ELLOS.

CUADRO 4.- DIAGRAMA DE LOS RESULTADOS DE LAS 31 CEPAS DEL VFPC, ANTE ANTICUERPOS MONOCLONALES PRODUCIDOS CONTRA LA CEPA BRESCIA

CEPA	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
ALFORT 2.3.1.												
ALFORT 2.3.2.											d	
BRESCIA 2.1.1												
HENKEN												d
ZOELEN												
331												
BAI												
CORNELL												
BEIERING												
PAV-250.												
BRESCIA 1.1.1.												
NEW LEDERLE												
ALFORT												
AMES					d							
GPE												
ALD												
C-SU (CHINA)				d								d
MINNESOTA-SU'							d					d
PAV-I-SU'							d					d
CEDIPEST												d
JONGEN												
WILD ROAR												d
P-4												
P-5												
89-55												
89-126												
MIN-P												d
PAV-250-P												
BAKER A 1.2.1												
SPRUTT 2												
JONGERBREUER												

LAS AREAS SOMBRADAS CORRESPONDEN A LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES A LOS QUE REACCIONO CADA UNA DE LAS CEPAS. MIENTRAS QUE LOS AREAS BLANCAS INDICAN LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES A LOS CUALES NO REACCIONARON LAS "CEPAS". POR LO TANTO CARECEN DE ESTOS ANTIGENOS. LA LETRA d-REACCION DEBIL.

CUADRO 5.- RESULTADOS DE LA DIFERENCIACION DE SEIS "CEPAS" DEL VFPC, CON ANTICUERPOS MONOCLONALES.

CEPA	ANTICUERPOS MONOCLONALES PREPARADOS CON LA CEPA BRESCIA											
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
BRESCIA												
MINN												d
PAV-1												d
PAV-250												
89-126												
89-55												
A.I.D												

LAS ÁREAS SOMBREADAS CORRESPONDEN A LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES A LOS QUE REACCIONÓ CADA UNA DE LAS CEPAS, MIENTRAS QUE LOS ÁREAS BLANCAS INDICAN LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES A LOS CUALES NO REACCIONARON LAS "CEPAS", POR LO TANTO CARECEN DE ESTOS ANTIGENOS. LA LETRA d REACCIÓN DÉBIL.

CUADRO 6. RESULTADOS DE LOS TITULOS PROMEDIO OBTENIDOS POR INMUNOFLORESCENCIA E INMUNOPEROXIDASA Y DIFERENCIACION CON ANTICUERPOS MONOCLONALES DE LAS SEIS CEPAS DEL VFC SELECCIONADAS DE LOS ESTUDIOS ANTERIORES.

No.	CEPA	IF	IP	AcMc Y P	AcMc/EPC
1	MINNESOTA	$10^{1.7}$	$10^{1.5}$	(-) BVD (-) BD	-5,6,8,13d
2	PAA-1	$10^{1.7}$	$10^{1.5}$	(-) BVD (-) BD	-5,6,8d,13d
3	89-126	$10^{1.9}$	$10^{1.7}$	(-) BVD (-) BD	-6,8
4	89-55	$10^{1.9}$	$10^{1.8}$	(-) BVD (-) BD	-6,8
5	PAA-250	$10^{1.8}$	$10^{1.6}$	(-) BVD (-) BD	-6
6	ALD	$10^{1.5}$	$10^{1.5}$	(-) BVD (-) BD	-5,6,8

IF= Inmunofluorescencia IP=Inmunoperoxidasa AcMc= Anticuerpo Monoclonal P=Policlonal d=reaccion debil

5. DISCUSION

Las 17 "cepas" que fueron cultivadas en una suspensión celular de tejido linfoide (cultivo primario con células no clasificadas) y se obtuvo una replicación similar de cada una, como lo demuestra la concentración de proteínas, que se muestra en el Cuadro 2 del primer capítulo.

Se obtuvo suficiente concentración viral considerada como "semilla" a partir de todas las "cepas" en este cultivo primario de tejido linfoide, para todos los subsecuentes estudios realizados en líneas celulares. Después, estas "cepas" se replicaron en cultivos celulares de la línea SK-6; en esta línea celular se realizó el aislamiento, identificación, tipificación, tinción y titulación, en el primer pase, no se recuperó ninguna "cepa" de las 17 trabajadas. Se repitió el mismo proceso para realizar un segundo pase y el resultado fue que se recuperaron sólo 3 "cepas" (Minnesota, PAV-250, 89-55), el resto de las "cepas" fueron cultivadas en células PK-15, y repitiendo todo el proceso, se recuperaron otras 3 "cepas" (PAV-1, 89-126 y ALD), se procedió a realizar un tercer pase en SK-6 y se logró concentrar a las 6 "cepas" que se lograron recuperar. Las 11 "cepas" restantes no mostraron replicación.

El título obtenido por inmunofluorescencia mostró claramente que las "cepas" de referencia, AMES, Lederle y ALD tuvieron los títulos más altos, al ser comparados con respecto a las "cepas" vacunales y las de campo, como era de esperarse, por ser altamente virulentas; las "cepas" vacunales tuvieron títulos muy similares (Cuadro 5).

Entre los AcMs del Grupo A, se encuentran los números 2, 3, 4, 7, que reconocen los sitios neutralizantes y conservados de la glicoproteína E1 y se subclasifican en A1; en este trabajo se reconocieron estos sitios en las 31 "cepas" estudiadas; con respecto a los AcMs 9, 10 y 11 que reconocen sólo sitios conservados de la glicoproteína E1 y que se subclasifican en A2, también fueron reconocidos por las "cepas" estudiadas. El análisis del determinante antigénico revelado con el monoclonal 12 presente en el grupo A (A3) no se presentó en las "cepas" de Alemania, Francia, Holanda y Polonia ("cepas" europeas) y tampoco en dos "cepas" de campo mexicanas; el AcM 12 también da positivo con el AcM 2 y a veces con los AcMs 3, 4 y 7, pero no con los AcMs 9, 10 y 11, lo que muestra el sitio neutralizante en el grupo A, no importando si la cepa es de alta, mediana o baja virulencia, o si es de campo.

Con respecto al AcM 6 que pertenece al grupo B no se encontró en todas las "cepas" (excepto en las polacas), también no importando su virulencia, en el caso de la cepa vacunal PAV-250, no se encontró reacción a este AcM sitio que es neutralizante. Los AcMs del grupo C (1, 5 y 8), son anticuerpos que reconocen sitios neutralizantes de la glicoproteína; el AcM 5 no reaccionó en las "cepas" europeas, japonesas, ni americanas, incluyendo a las mexicanas y también no importando su virulencia, solo una cepa si reconoció ese determinante antigénico y fue la PAV-250. Con respecto al otro sitio del grupo C (8), no lo tuvieron, las "cepas" de Alemania, Francia, Japón y "algunas" de EUA (la 331 y la PAV-250 si reaccionaron) y fueron "cepas" de alta, mediana y baja patogenicidad; las "cepas" de Polonia y Holanda y algunas "cepas" de EUA de alta y baja virulencia y de campo, sí presentaron dicho determinante antigénico.

De tal manera que el AcM 8 aunado con el monoclonal 3 y un policlonal hiperinmune a virus completo, permite reconocer "cepas" de FPC de campo diferenciadas de las "cepas" del virus de la Diarrea Viral Bovina (Cuadro 1). El Cuadro 2 muestra la función de los AcMs más importantes (1, 2, 3, 4 y 12), sin embargo, no se pudo trabajar con el AcM 1, que reacciona con las cepas vacunales, porque las clonas, productoras de este AcM se perdieron en el laboratorio y no ha sido posible recuperarlas y por lo tanto no se logró obtener información a este respecto..

Las 6 "cepas" nacionales resultaron ser positivas a los AcMs 3 y 8 demostrándose con esto que son "cepas" del VFPC. Al comparar la tipificación de las "cepas" nacionales, con las internacionales, no se observaron diferencias marcadas, ante el ensayo con los AcMs (5,6,8,13), ante los cuales no reaccionaron las "cepas". Sólo la cepa vacunal PAV-250 no mostró reconocimiento al AcM6.

La interpretación de los resultados de identificación por Inmunoperoxidasa (IPT), se realizó utilizando los AcMs 3 y 8 y un conjugado policlonal, como lo muestra el Cuadro 1. Un resultado positivo con IFD puede ser causado por el virus de campo de la FPC, virus vacunal o virus de la DVB ó por el virus de la Enfermedad de la Frontera (BD), de aquí la importancia de utilizar anticuerpos monoclonales y no sólo la técnica de IFD con un conjugado policlonal que nos podría dar un falso positivo.

En el Cuadro 4 se muestran los resultados que presentaron las 31 "cepas" ante los 12 AcMs, lo cual nos permite suponer que no existen diferencias definitivas en términos generales, ya que no hay cambios importantes con respecto al tipo de "cepa" (vacunal, de campo o de referencia), o que indique si son de (alta, mediana o baja virulencia); sin embargo estos resultados nos permitieron tener un panorama amplio y tener una herramienta más para seleccionar 6 "cepas" que fueron aquellas a las que se les realice el resto de los estudios. De esta forma en el Cuadro 5 podemos observar que se seleccionaron 3 "cepas" vacunales, 2 "cepas de campo y una "cepa" de referencia, además de la "cepa" de referencia Brescia, sólo para este estudio, de las cuales la más importante es la "cepa" vacunal PAV-250, que reaccionó casi a todos los AcMs a excepción del AcM6, por lo cual si el resto de los resultados coincidieran en apoyar que esta "cepa", podría ser "candidata" a ser utilizada como un posible marcador. La mayoría de las demás "cepas" no reaccionaron a los AcMs 5, 6 y 8 y algunas al 12 y 13. El sólo recuperar 6 "cepas" de 17 que se llevaron al laboratorio de Lelystad, Holanda muy probablemente fué debido al tipo de cultivo celular en el que se pretendió multiplicarlas, ya que tenían variable grado de adaptación en México, a la línea celular PK-15 mientras que en Holanda se utilizó la línea celular SK-6 que aunque en principio las dos son de riñón de cerdo, aparentemente hubo diferencias en el grado de adaptación de cada virus de FPC a cada una de ellas; sin embargo los resultados que se lograron obtener al trabajar con las 31 "cepas" de diferentes países permitieron observar que no hay un cierto patrón de AcMs relacionado con el lugar de procedencia, o entre ciertas "cepas". Estos estudios también permitieron observar que las clonas celulares que se sacaron de congelación para llevar a cabo este estudio con los AcMs producidos por ellos resultaron no ser tan estables como lo esperaban, conservadas en congelación a -70 C.

Finalmente y quizá lo más importante es que se logró recuperar y replicar 6 "cepas" del VFPC, resultando ser efectivamente VFPC y no estar contaminadas con el virus de la DVB o el virus del BD, los títulos obtenidos de estas "cepas" también resultaron ser buenos y las "cepas" vacunales no estaban contaminadas con otros virus.

7. BIBLIOGRAFIA:

Bloemraad, M. Detection and differentiation of pestiviruses isolated from pigs in the framework of hog cholera diagnosis. Laboratory Manual of Diagnosis procedures for Hog Cholera as Performed at the central Veterinary Institute, Lelystad, Netherlands. pp. 1-22.

Edwards, S., Moening, V., Wenvoort, G. (1990). The development of an international reference panel of monoclonal antibodies for the differentiation of Hog Cholera virus from other pestiviruses. *Vet. Microbiol.* 29 (2): 101-108.

Edwards, S., Sands, J.J. (1990). Antigenic comparisons of Hog Cholera virus isolates from Europe, America and Asia, using monoclonal antibodies, *Dts, Tier, Woench*, 97 (2):79-81.

Graham, R.C. Lindholm, U. and Karnovsky, M.J. (1965). Cytochemical demonstration of peroxidase activity with 3-amino-9-ethylcarbazole. *J. Histochem. Cytochem.*, 13:150-152.

Greiser, W.I., Dittmar, K., Moening, V. (1992). Heterogeneous expression of the non-structural proteins p80/p125 in cells infected with different pestiviruses. *J. Gen. Virol.* 73:47-52.

Hitchcock, P., Brown, T., (1983). Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver stained polyacrylamide gels. *J. bacteriol.* 154 (1): 269-277.

Holm J.M. (1981). Detection of antibodies against hog cholera virus and bovine viral diarrhoea virus in porcine serum. *Acta Vet. Scand.* 22: 85-98.

Hulst, M., Westra, D., Wenvoort, G, Moorman, R. (1993). Glycoprotein E1 of Hog Cholera. *J. Virol.* pp. 5435-5442.

Jijl, M., Wenvoort, G., Kluyver, E. Hulst, M. Gulden, H., Gielkens, A., Berns, A., Moorman, R. (1991). Live attenuated pseudorabies virus expressing envelope glycoprotein E1 of Hog Cholera virus protects swine against both Pseudorabies and Hog Cholera. *J. Virol.* 65(5) 2761-2765.

Kresse, B.S., Stewart, W., Carbery, E., Snyder, B. (1976) Sensitivity of swine buffy coat culture to infection with Hog Cholera Virus. *Am. J. Vet. Res.* Vol. 37 No. 11 pp. 1315-1318

Mendoza, E.S., Correa, G.P., Hernández, B.E., y Ciprián, A.C. (1992). Perspectiva de un Método de diagnóstico serológico rápido para Fiebre Porcina Clásica. XXVII Congreso Nacional AMVEC, Acapulco, Gro, pp. 54.

Mendoza, E.S., Correa, G.P., Ayala, G., Hernández, B.E., y Ciprián, A.C. (1994). Biological differences among field reference and vaccinal strains of Hog Cholerae virus. IPVS, Bangkok, Thailandia, pp. 83.

Mendoza, E.S., Correa, G.P., Terpstra, C. Bloemraad, M., Hernández, B.E., y Ciprián, A.C. (1994). Typing of Hog Cholera virus four field strains isolated in Mexico using Monoclonal Antibodies. IPVS, Bangkok, Thailandia, pp. 82.

Mendoza, E.S., Correa, G.P., Terpstra, C. Bloemraad, M., Hernández, B.E., y Ciprián, A.C. (1994). Typing of Hog Cholera virus strains from various countries by using Monoclonal Antibodies. IPVS, Bangkok, Thailandia, pp. 81.

Moening, V., Schagemann, G., Dahle, J., Gresiser, W., Leder, L. (1990). A new approach for the diagnosis of Hog Cholera. Dtsch. tierärz. Wochenschr. 97 (2):91-93.

Ramirez, N.R. Reynoso, G. (1993). Fiebre Porcina Clásica. Alsa Consultores, pp 1-111.

Rovozzo, G., Burke, C. (1973). A Manual of Basic Virological Techniques. Prentice Hall. pp.38-62.

Rumenapf, T., Stark, R., Meyers, G., Thiel, H. (1991). Structural proteins of Hog Cholera Virus expressed by vaccinia virus: Further characterization and induction of protective immunity. J. Virolog. pp 589-597.

Thiel, H., Stark, R., Weiland, E., Rumenapf, T. Meyers, G. (1991). Hog Cholera Virus molecular composition of virions from a Pestivirus. Journal Virology pp 4705-4712.

Terpstra, C; Bloemraad, M. and Gielkens, A.L. 1984. The neutralizing peroxidase-linked assay for detection of monoclonal antibodies in epitopes on structural proteins of Hog Cholerae (Swine Fever) virus. Vet. Microbiol. 9 pp. 113-120.

Wensvoort, and Terpstra, C (1988). Bovine Viral diarrhoea infections in piglets born from sows vaccinated against swine fever with contaminated vaccine. *Res. Vet. Sci.* 45: 143-148.

Wensvoort, G., Bloemraad, M. and Terpstra, C (1988). An enzyme-immunoassay, employing monoclonal antibodies and detecting specifically antibodies against classical Swine Fever virus. *Vet. Microbiol.* 17, 129:140.

Wensvoort, C. Terpstra, E.P de Kluyver, C. Kragten, J.C. Warnaar. (1989). Characterization of pestivirus strains with monoclonal against Hog Cholera Virus in Epitopes on structural proteins of Hog Cholerae (Swine Fever) virus. Thesis. p. 41-50.

Wensvoort, G. Terpstra, C., Boonstra, J., Bloemraad, M. and Van Zaane, D. (1986). Production of monoclonal antibodies against swine fever virus and their use in laboratory diagnosis. *Veterinary Microbiology* 17, 129-140.

Wensvoort, G. (1989). Epitopes on structural proteins of Hog Cholera (Swine Fever) virus. Thesis doctor. Utrecht, March, 1989.

Weiland, G., Moening, V, Coulibaly, Z., Dahle, J., Leder, L. Liess, B. (1990). Identification of conserved epitops on a Hog Cholera virus protein. *Arch Virol.* 11 pp 213-225.

Van Rijn, P.A, van Gennip, P, Meijer, E., Epitope mapping of envelope glycoprotein E1 of Hog Cholera virus strain Brescia. *J. Virology* 74 pp 2053-2060.

Wensvoort, G., Boonstra, J., Bodzinga, B. (1990). Immunoaffinity purification and characterization of the envelope protein E1 of Hog Cholera virus. *J. Gen. Virol.* 71 pp 531-540.

Zhou, Y., Moening, V. Coulibaly, C., Dahle, J., Liess, B., (1989). Differentiation of Hog Cholera and Bovine Virus Diarrhoea viruses in pigs using monoclonal antibodies. *Zentralbl. Vet.* 36(1) pp76-80.

CAPITULO 3

PURIFICACION DE LAS CEPAS DEL VFPC POR ULTRACENTRIFUGACION- GRADIENTE DE SACAROSA, ANALISIS DE DENSIDAD BOYANTE Y ESPECTROSCOPIA EN ULTRAVIOLETA.

RESUMEN.

En este trabajo se encontraron diferencias entre las "cepas" de campo, vacunales y de referencia, del virus de la Fiebre Porcina Clásica mediante, estudios de densidad boyante (DB) y espectroscopía en ultravioleta. Se obtuvieron un total de 12 fracciones a partir de cepa y se encontró que las fracciones 8 y 9 fueron las más importantes, para las "cepas" vacunales: Minnesota, PAV-1, PAV-250 y para las cepas de campo 89-126 y para la cepa 89-55, otras fracciones importantes fueron la 10 y la 11; para la cepa de referencia ALD las fracciones importantes fueron 3-4 y 9-10. La DB mostro ligeras diferencias entre "cepas", así las de campo mostraron una DB de 1.114 ± 0.002 g/ml; las "cepas" vacunales mostraron una DB un poco mayor 1.135 ± 0.011 g/ml, y la cepa de referencia ALD mostró una DB más elevada de 1.184 g/ml. Los espectros mostraron que todas las "cepas" presentan picos de absorbancia de aproximadamente 240 a 280 nm, que corresponden a las absorbancias de los aminoácidos aromáticos de las proteínas y a los ácidos nucleicos, respectivamente. Las cepas ADL y la 89-55 presentaron otros máximos de absorbancia.

SUMMARY

This study conducted in order to find differences in bouyant density (DB) and ultraviolet spectroscopy (UVS) among field, vaccinal and reference "strains" of Hog Cholerae. vaccinal "strains" used were: Minnesota, PAV-1 and PAV-250; reference strain was: ALD; and field "strains" were: 89-126 and 89-55. All "strains" were ultracentrifuged at 4 C (35,000 x g during 1.5 hs., using sucrose gradients (70%, 50%, 30% and 20%). A spectrum of 200 o 320 nm was made. The Minnesota strain had a DB of 1.146 g/ml and $r=0.83$ and the UVS revealed an AP (absorbance peak) of 245.86 nm and another at 284 nm. The PAV-1 strain had a DB of 1.134, $r=95.5$ and AP at 242.54 and 279.71 nm. The PAV-250 strain had DB of 1.124 g/ml and $r=0.985$ and a peak at 246.28 nm and another at 282.28 nm. The reference ALD "strain" presented DB of 1.184 g/ml and $r=0.944$, and "plateau" from 255.28 to 298.57 nm, and two peaks at 248 and 279.14 nm. the field strain 89-126 had a DB of 1.116 g/ml, $r=0.992$, and a one peak at 236 and another at 280.57 nm. The field "strain" 89.55 had a DB of 1.112 g/ml, $r= 0.986$ and a "plateu" from 264.28 to 285.71 nm. In the sucrose gradient, the DB and the UVS of the "strains" twelve fractions were obtained; the more important fractions were 8 y 9 from vaccinal "strains" Minnesota, PAV-1, and PAV-250 and from field "strains" 89-55 and 89-126. For the reference "strains", heaving field "strains" a mean of 1.114 ± 0.002 g/ml, vaccinal "strains" 1.135 ± 0.011 g/ml, and reference strain had 1.184 g/ml. The UVS's showed that all "strains" presented absorbances peas from 236 to 284 nm, wich belongs to aromatic aminoacids of proteins and nucleic acids respectively. The "strains" ALD and 89-55 shower higher maximal absorbances.

1. INTRODUCCION:

El diagnóstico serológico de la FPC, se utiliza la prueba de SN y de ELISA y aunque estas técnicas son una herramienta útil para evaluar fallas en la respuesta de anticuerpos después de la vacunación, para detectar animales que padecieron la enfermedad subclínica (cerdos infectados y recuperados), o bien para utilizarlas en los sistemas de vigilancia epizootológica. Sin embargo no se cuenta con una técnica serológica que permita diferenciar los cerdos con anticuerpos vacunales de los que tienen anticuerpos estimulados por el virus del campo. En un trabajo correspondiente a esta misma tesis (Mendoza *et al*, 1992) encontraron diferencias entre las "cepas" de capo, vacunales y de referencia, en cuanto a su comportamiento durante su proliferación en líneas celulares PK-15 y SK-6 y en cultivos primarios de órganos linfoides, los resultados mostraron que existieron diferencias entre ellas en lo concerniente a su patogenicidad; lo cual fue hecho, con la idea de encontrar características biológicas diferenciales, que sean propias de las "cepas" de FPC, ya sean de campo, vacunales o de referencia. Wensvoot y *et al*, en Holanda (1989) purificaron la cepa Brescia del VFPC a partir de lisados de cultivos celulares infectados y empleando un gradiente de glicerol al 30-0%/ con tartrato de Na-K al 0.55%, encontraron que la fracción proteínica aislada a una densidad boyante de 1.13 - 1.15 g/ml, presentaba altos títulos infectantes, mientras que en la fracción d 1.12 - 1.14 g/ml mostraba presentaba alta afinidad en ECA. A las siete fracciones individuales presentes en estos dos "picos" se les realizó una electroforésis en gel de policrilamida-SDS. Las primeras tres fracciones que pertenecieron a la fracción de alta infectividad sólo se encontraron la gp54 y la gp51; mientras que en las otras fracciones con alta afinidad al ECA y baja infectividad, revelaron solo la gp 31.

Westaway, en 1985, parece haber purificado al VFPC, a partir de lisados de células infectadas; para la purificación del virus, encuentra que la gp31 estaba más asociada a las fracciones de alta finidad al ECA, en densidades 1.12-1.14 g/ml, que con fracciones de alta infectividad y densidad de 1.14 g/ml. Como con la prueba de ECA se detecta específicamente la E1, estos hallazgos sugieren que en la mayoría de antígeno E1 detectado en el pico ECA, son viriones están unidos en forma no estructural, pero sí como complejo con la gp 31. Posiblemente estas densidades detectadas en el complejo gp 31-E1 están unidas a las membranas de la célula hospedadora y no incorporadas en el virión (Weenvoort, 1989). Estos resultados concuerdan con los encuentros de Laude (1977), quién encontró que los viriones del VFPC, purificados por gradiente, estaban fuertemente contaminados componentes celulares. Otra posible explicación puede ser que la gp31 se encuentra únicamente en viriones inmaduros, en el mismo sentido que la proteína pre-M de los Flavivirus.

2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Realizar la purificación viral de las seis "cepas" del VFPC, mediante ultracentrifugación con un gradiente de sacarosa.
2. Realizar Estudios Comparativos para encontrar diferencias entre seis "cepas" de campo, vacunales y de referencia del VFPC mediante estudios de densidad boyante.
3. Realizar Estudios Comparativos para encontrar diferencias entre seis "cepas" de campo, vacunales y de referencia del VFPC mediante estudios de espectroscopía en ultravioleta.

3. MATERIALES Y METODOS.

3.1. MATERIAL BOLOGICO:

Se utilizaron 6 "cepas" diferentes (tres "cepas" vacunales: Minnesota, PAV-1 y PAV-250; una de referencia: ALD; y dos "cepas" de campo: (89-126 y 89-55) del Virus del FPC ya seleccionadas previamente, con base a los resultados obtenidos, en el Capítulo 1.

3.2. GRADIENTE Y PURIFICACION DEL VFPC:

Las seis "cepas" seleccionadas fueron purificadas a partir de los cultivos celulares infectados, las cuales fueron suspendidas en buffer TNE (0.1 M tris, 0.001M NaCl, 0.001 M EDTA, pH7.4). Los virus fueron concentrados (1:10) por precipitación con 7% de (policetilenglicol 20,000), durante toda la noche. Los "pellets" fueron resuspendidos en buffer TNE, posteriormente fueron puestas cada cepa en el gradiente de sacarosa (sacarosa 99.9% de pureza) de 20, 30, 50 y 70% en tubos especiales de 12 mililitros (Quick seal 16x76mm. Beckman Instruments); se sellaron y se procedió a la ultracentrifugación durante 1.5 hr a 31,000 rpm a 4 C en una ultracentrifuga Beckman L-2 65B Rotor 65 Ti., de ángulo fijo (Purchio, A.F. *et al.*, 1984; Wensvoort, 1989).

3.3. COLECCION DE MUESTRAS Y SELECCION DE FRACCIONES.

De las 6 "cepas" fueron recuperadas 72 fracciones en total de aproximadamente 1 ml en tubos Eppendorf. Las fracciones se colectaron por punción en el fondo del tubo, correspondiendo la primera fracción al fondo del tubo y así sucesivamente hasta llegar a la parte superior correspondiéndole la fracción 12, las cuales posteriormente fueron estudiadas y seleccionadas (Mendoza *et al*, 1994).

3.4. ESPECTRO EN ULTRAVIOLETA:

A todas las "cepas" con un espectrofotometro Beckman (DU-64), se les realizó un barrido de espectro (EUV) de 200 a 320 nm y las fracciones obtenidas se les determinó su gráfica a cada una de ellas, cabe mencionar que la escala vario en algunas ocasiones, pero al registrar las lecturas se corrigieron (Mendoza *et al.*, 1994).

3.5. DIALISIS, CONCENTRACION DEL ANTIGENO Y DETERMINACION DE CARBOHIDRATOS.

Cada fracción seleccionada de las 6 "cepas" en estudio fué dializada en membrana de dialisis de 14,000 MW, contra agua desionizada, con el fin de eliminar el exceso de sacarosa obtenido del gradiente, para así tener la seguridad de que la muestra estuviera limpia, a cada muestra se le fué determinando la ausencia o dismunición de sacarosa. Para la determinación de carbohidratos, se siguió la técnica del Dr. Dubois, en la cual a 200 µl de la muestra, se le agregaron 20 µl de fenol, se le agregó 1 ml de H₂SO₄ concentrado (rápida y cuidadosamente); se agitó a temperatura ambiente durante 10 min, se incubó a 30 C durante 20 mins, y se leyó

a 490 nm; el color que se presentó fue estable en un lapso 2 a 3 horas, a temperatura ambiente (Dubois *et al*, 1956).

Después de comprobar que la muestra esta libre de sacarosa, se procede a concentrar cada fracción, de las muestras, lamabrana de diálisis conteniendo la muestra se pone en un recipiente con polietilenglicol de P.M 20,000. con un factor de concentración de 1:10, durante toda la noche a temperatura ambiente, las membranas se laan con el amortiguador TNE (Tris 0.1 M, NaCl 0.01 M, EDTA 0.001 M, con pH=7.4), para su posterior mención de proteínas.

3.5. DETERMINACION DE PROTEÍNAS.

A cada fracción se le determinó la concentración de proteínas, mediante el método de Kalb, (Kalb and Bernlohr, 1977). a) Medir la absorbancia de las fracciones a 230 nm; b) Medir la absorbancia de las fracciones a 260 nm; c) Hacer el cálculo siguiente: $183 A_{230} - 75.8 A_{260} = \text{microgramos/mililitro}$.

3.7. DENSIDAD BOYANTE.

La Densidad Boyante (BD) fué determinada por peso (100 µl de cada fracción). para esto se obtuvo la $D = \text{g/ml}$, por medio de $D = M/V$, los resultados se graficaron (Wensvoort, 1989, Mendoza *et al*, 1994).

3.8. ANALISIS ESTADISTICO.

A todas las fracciones se les deterinó su coeficiente de correlación mediante una regresión lineal, para comprobar si las muestras penetraron adecuadamente en el gradiente de sacarosa.

4. RESULTADOS

La "cepa" Minnesota presentó una DB de 1.146 g/ml, el gradiente tuvo una correlación (r) de 83 y el espectro en UV (EUV), reveló un pico de absorbancia a 245.86 nm y tres picos a 284 nm. La "cepa" PAV-1, presentó una DB de 1.134 g/ml, su gradiente una $r=94.5$ y el espectro mostró un pico de absorbancia a 242.54 nm y otro a 279.71 nm. La "cepa" PAV-250 tuvo una DB de 1.124 g/ml, una $r=98.5$ y el espectro reveló un pico a 246.20 nm y otro a 282.28 nm. En cuanto a la "cepa" de referencia ALD, esta tuvo una DB de 1.184 g/ml, una $r=94.4$ y el DB reveló una "meseta" desde 255.28 nm a 298.57 nm, un pco a 248 nm y otro a 29.14 nm. La "cepa" de campo 89-126 tubo DB de 1.116 g/ml, $r=99.2$ y el espectro mostró dos picos, uno a 236 nm y otro a 280.57 nm . La "cepa" de campo 89-55 tuvo DB=1.112, $r=98.6$ y su espectro mostró una "meseta" desde 264.28 nm a 285.71 nm, dos picos bien definidos uno a 243.07 nm y otro a 280.57 nm y dos picos juntos a 239.42 nm. Los valores de densidad boyante y los máximos de absorbancia registrados en el espectro de ultravioleta de las "cepas" estudiadas en este trabajo se muestran en el Cuadro 1.

Se obtuvieron 12 fracciones de cada "cepa", es decir un total de 72 fracciones, estas se dializaron contra TNE (Tris) para eliminar la Sacarosa. Cada fracción fué estudiada por espectroscopía de UV, los datos obtenidos para todas las fracciones fueron graficadas, midiendo la concentración de proteínas; que presentaban proteínas y ácidos nucleicos, de esta manera se fueron seleccionando sólo algunas fracciones; como ejemplo de los 72 espectros obtenidos por cada "cepa" se puede observar la secuencia de las gráficas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 11, 12 correspondientes a las 12 fracciones de la "cepa" de campo 89-55 (cabe mencionar que estas gráficas fueron obtenidas al leer cada muestra y de la computadora se imprimieron, en estas gráficas la escala no es correcta por lo que tuvo que ser corregida y los datos obtenidos son los que se muestran en el Cuadro 1.

CUADRO 1. RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS DE ESPECTROSCOPIA, FRACCIONES SEPARAS, POR GRADIENTE, COEFICIENTE DE CORRELACION Y DETERMINACION DE PROTEINAS DE LAS SEIS "CEPAS " ESTUDIADAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE PORCINA CLASICA .

"CEPA"	FRACC	PROT	DB δ =gr/ml 1.12-1.15	r	ESPECTRO ABS (λ)
MINNESOTA	8 Y 9	246.72	1.146	83	1 PICO 245.86 3 PICO 284
PAV-1	8 Y 9	331.00	1.134	94.5	1 PICO 242.54 1 PICO 279.71
89-126	8 Y 9	399.07	1.116	99.2	1 PICO 236 1 PICO 280.57
89-55	8 Y 9 10 Y 11	3369.03 186.74	1.112	98.6	F8 1 PICO 243.07 1 PICO 280.57 F10 2 PICO 239.42 1 MESETA 264.28 285.71
PAV-250	8 Y 9	413.11	1.124	98.5	1 PICO 246.28 1 PICO 282.28
ALD	3 Y 4 9 Y 10	213.72 222.31	1.184	94.4	F9 1 MESETA 255.28 298.57 F3 1 PICO 248 1 PICO 279.14

Frac=Fracción; Prot=Proteínas; r=Regresión Lineal; δ = Densidad DB=Densidad Boyante r= Coeficiente de correlación; Abs=Absorbancia y F=Fracción.

Regression Analysis - Linear model: Y = a+bx

Dependent variables: DENS8955, DENSIDADOP Independent variables: DENS8955, FRACCION

Parameter	Estimate	Standard Error	T Value	Prob. Level
Intercept	1.28489	9.31424E-3	129.601	.00000
Slope	-0.0262040	1.46177E-3	-17.9607	.00000

Analysis of Variance

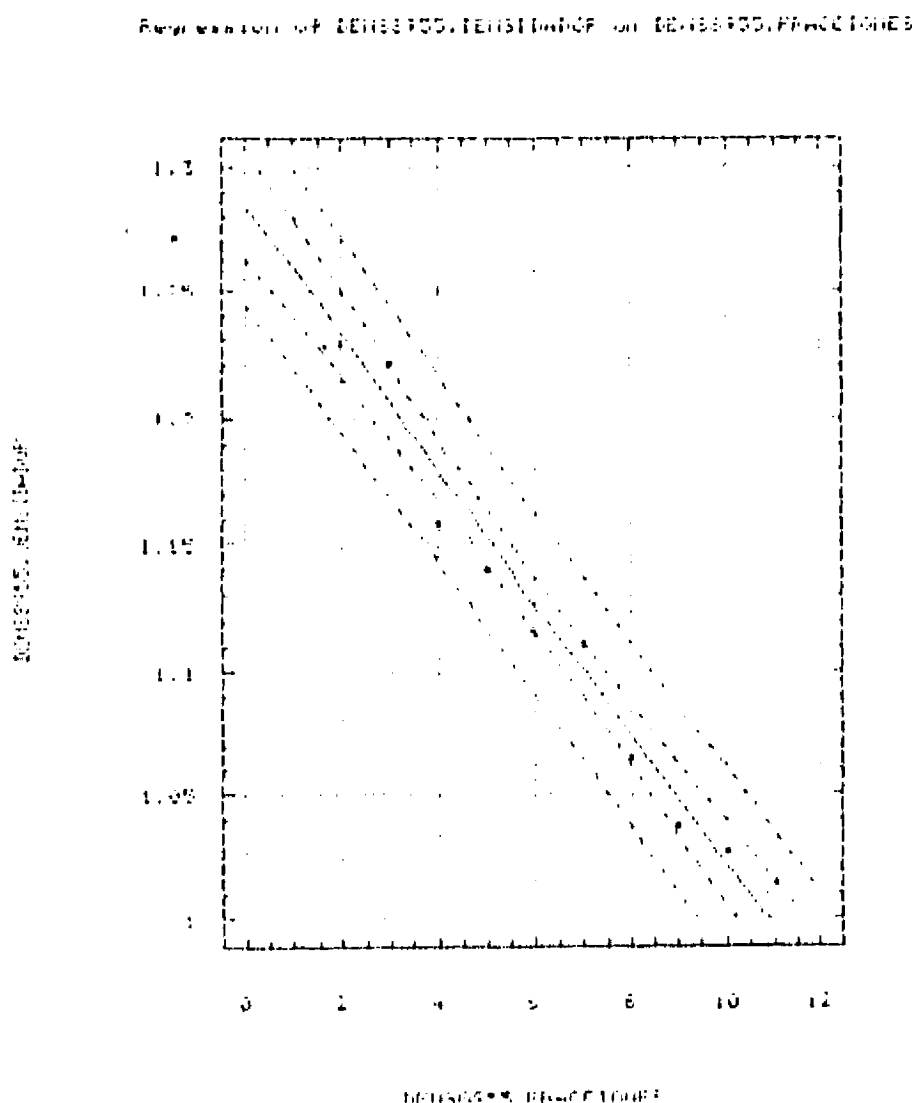
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	Prob. Level
Model	.07532	1	.07532	322.5378	.00000
Error	.0021154	9	.0002350		
Total (Corrected)	.0774354	10			

Correlation Coefficient = -0.986336 R-squared = 97.29 percent
 Std. Error of Est. = 0.0153512

Press ENTER to continue.

1Help 2Edit 3Save 4Print 5 6Go 7Vars 8Cmd 9Device 10Quit
 INPUT 4/14/92 02:24 STATGRAPHICS Vers. 2.6 Display REG

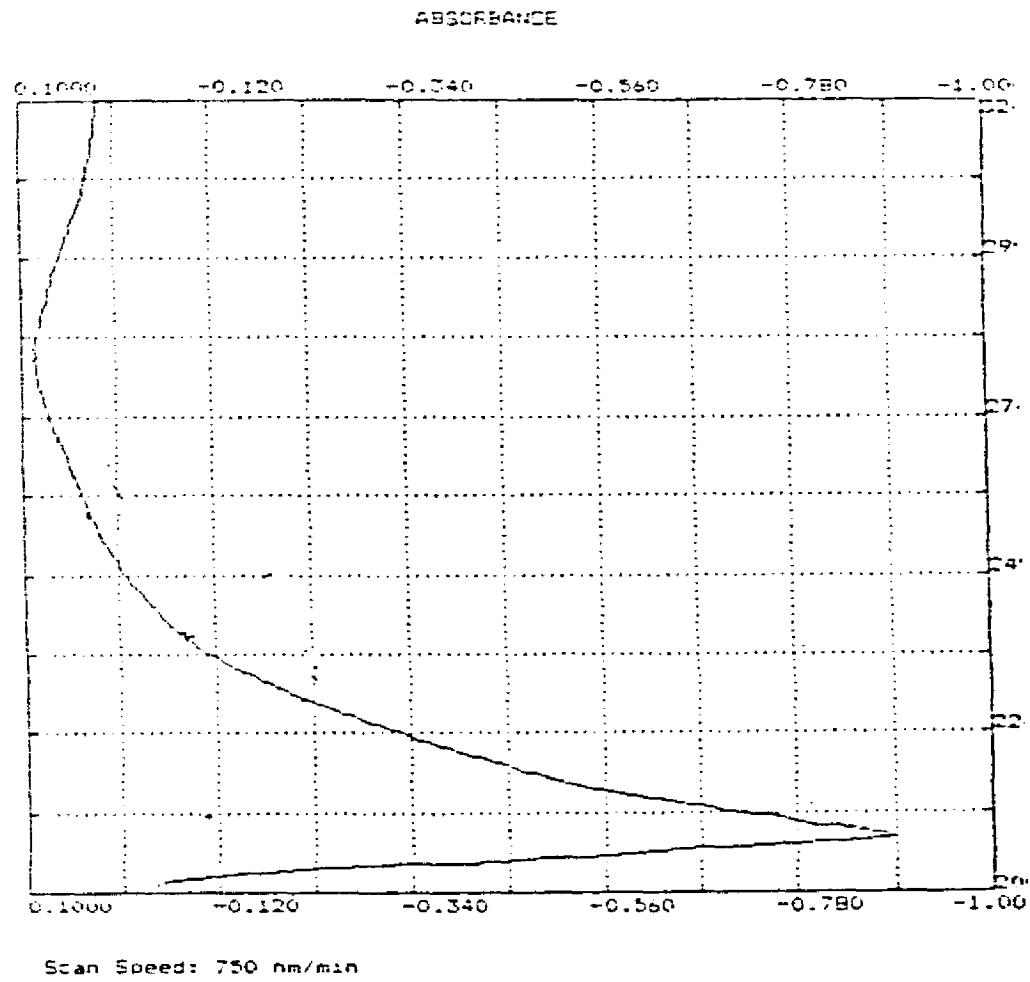
CUADRO A.- REGRESION LINEAL DE LA 'CEPA' 89-55



GRAFICA 1.- REGRESION LINEAL DE LA 'CEPA' 89-55

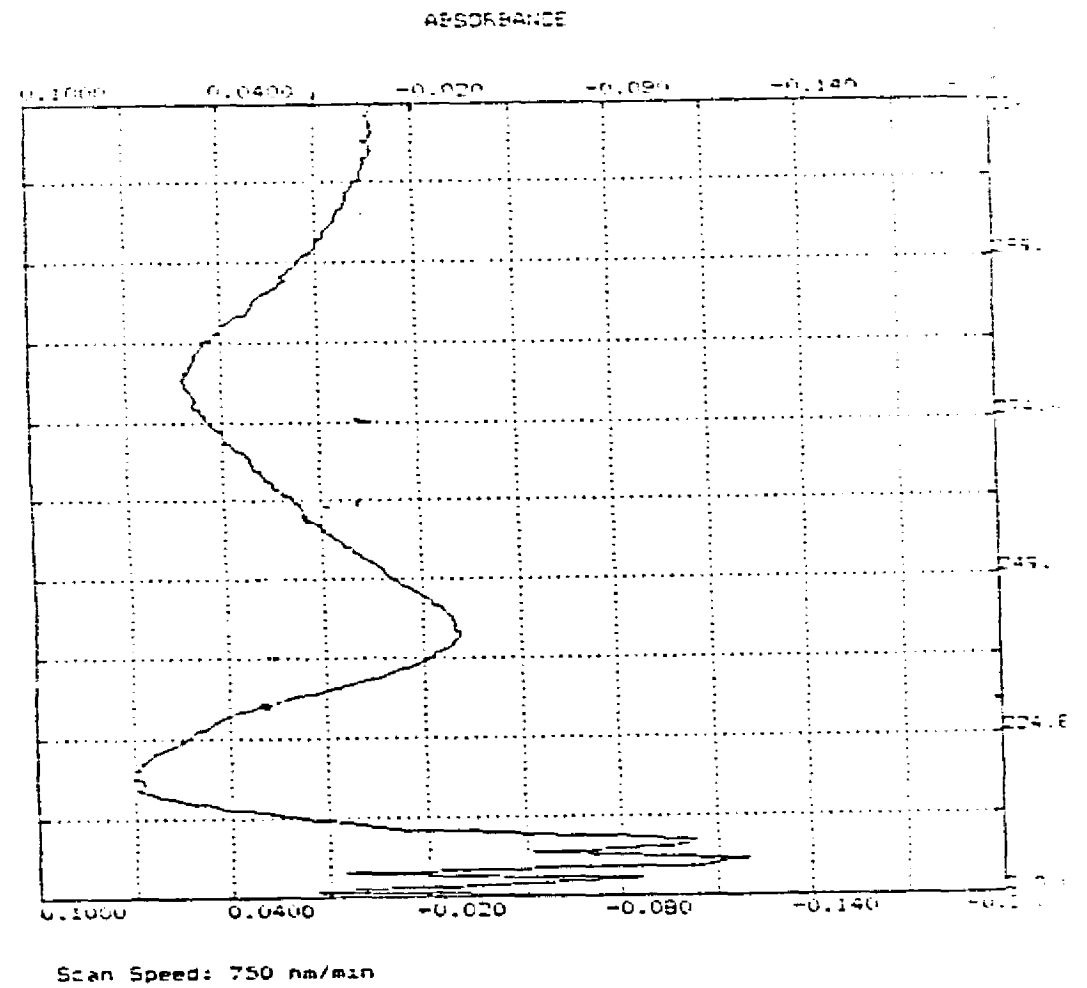
FALLA DE ORIGEN

BECKMAN
DU-64 SPECTROPHOTOMETER



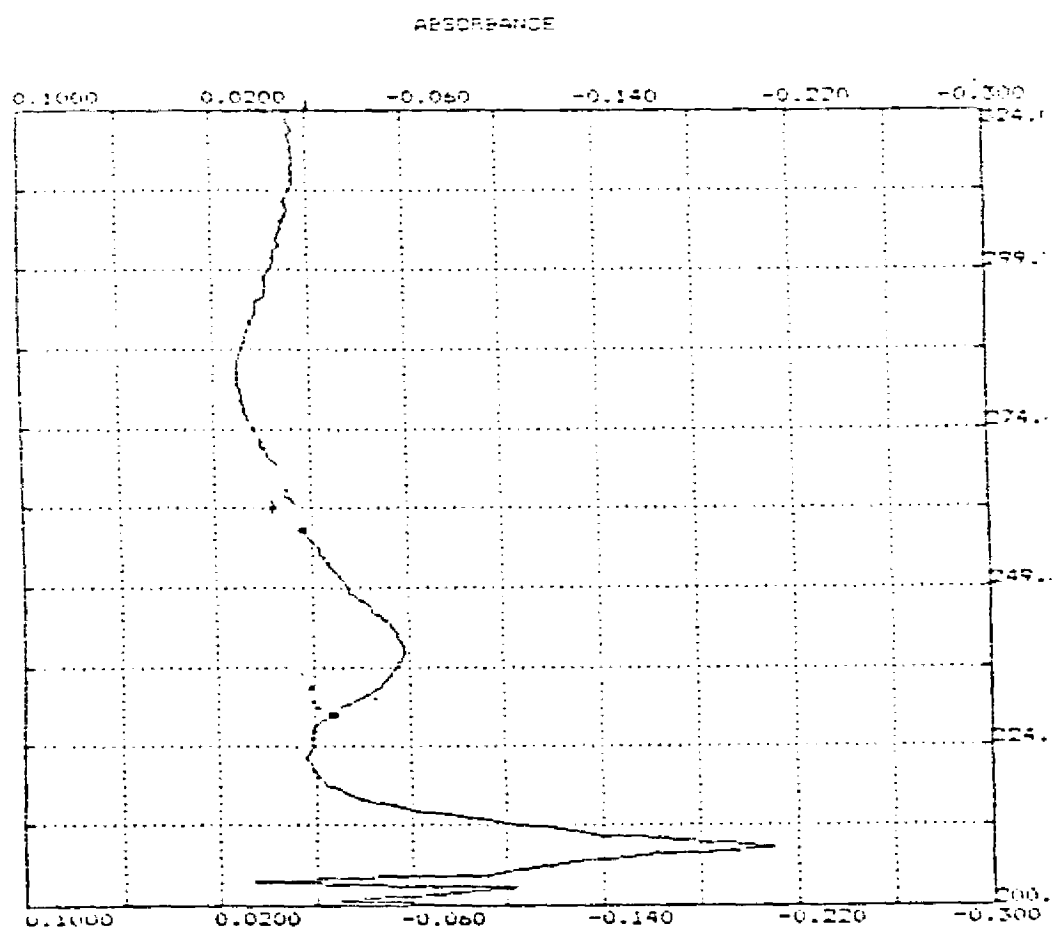
GRAFICA 2.- BARRIDO DE 200 A 324 nm DE LA
FRACCION 1 DE LA CEPAs 89-55

BECKMAN
DU-64 SPECTROPHOTOMETER



GRAFICA 3.- BARRIDO DE 200 A 324 nm DE LA
FRACCION 2 DE LA CEPAs 89-55

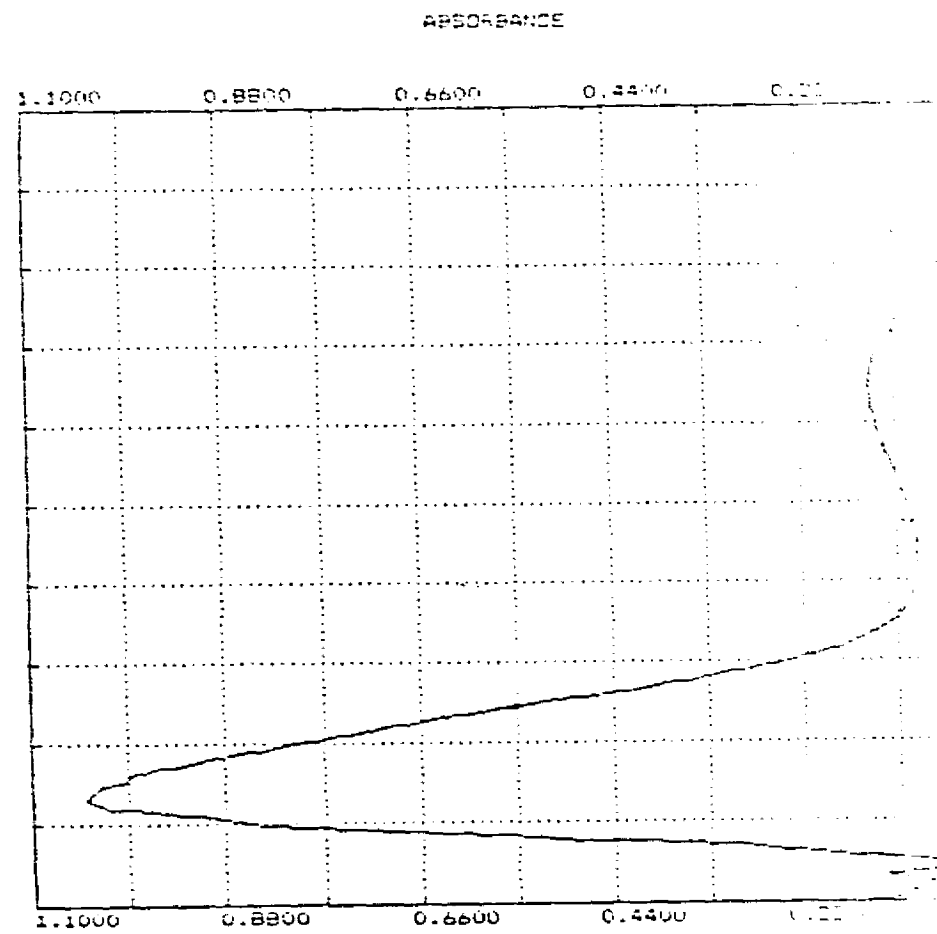
BECKMAN
DU-64 SPECTROPHOTOMETER



Scan Speed: 750 nm/min

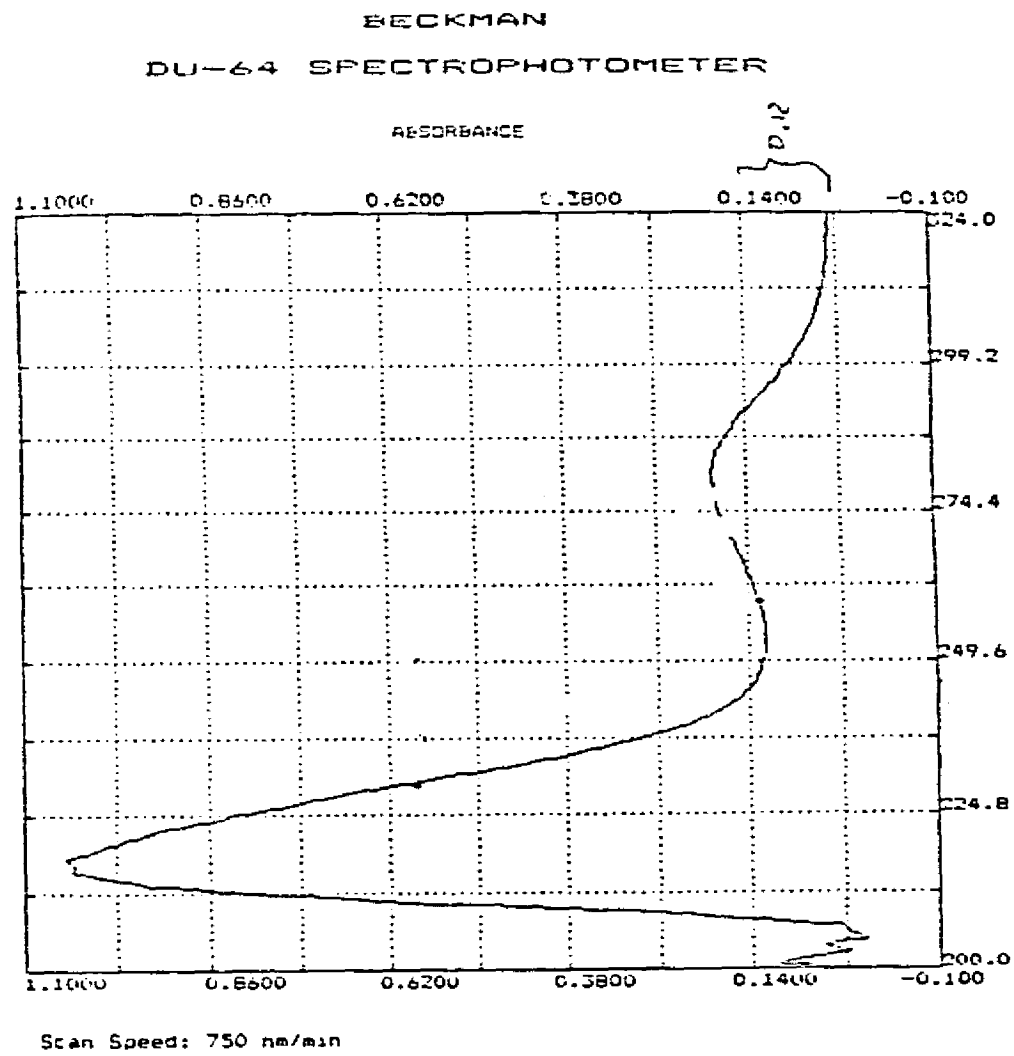
GRAFICA 4.- BARRIDO DE 200 A 324 nm DE LA
FRACCION 3 DE LA CEPAS 89-55

BECKMAN
DU-64 SPECTROPHOTOMETER

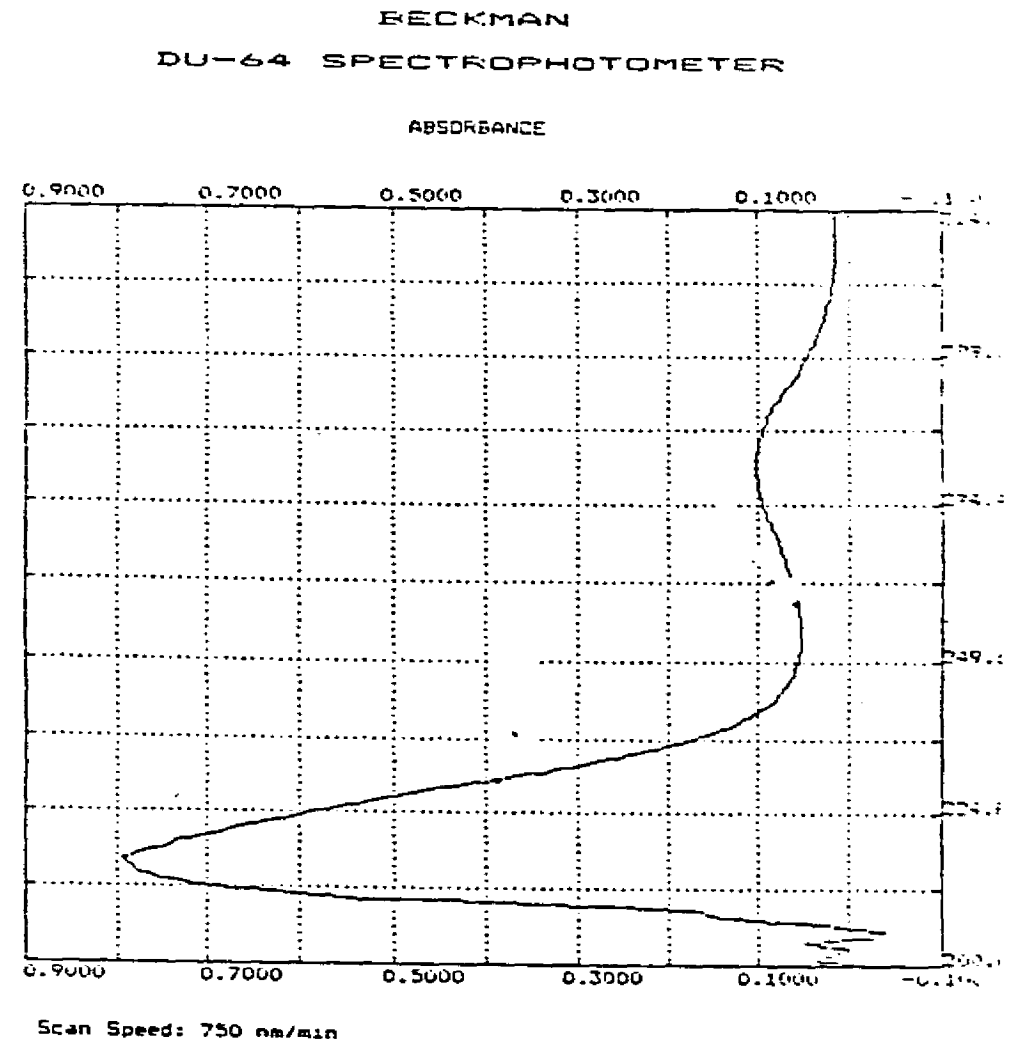


Scan Speed: 750 nm/min

GRAFICA 5.- BARRIDO DE 200 A 324 nm DE LA
FRACCION 4 DE LA CEPAS 89-55

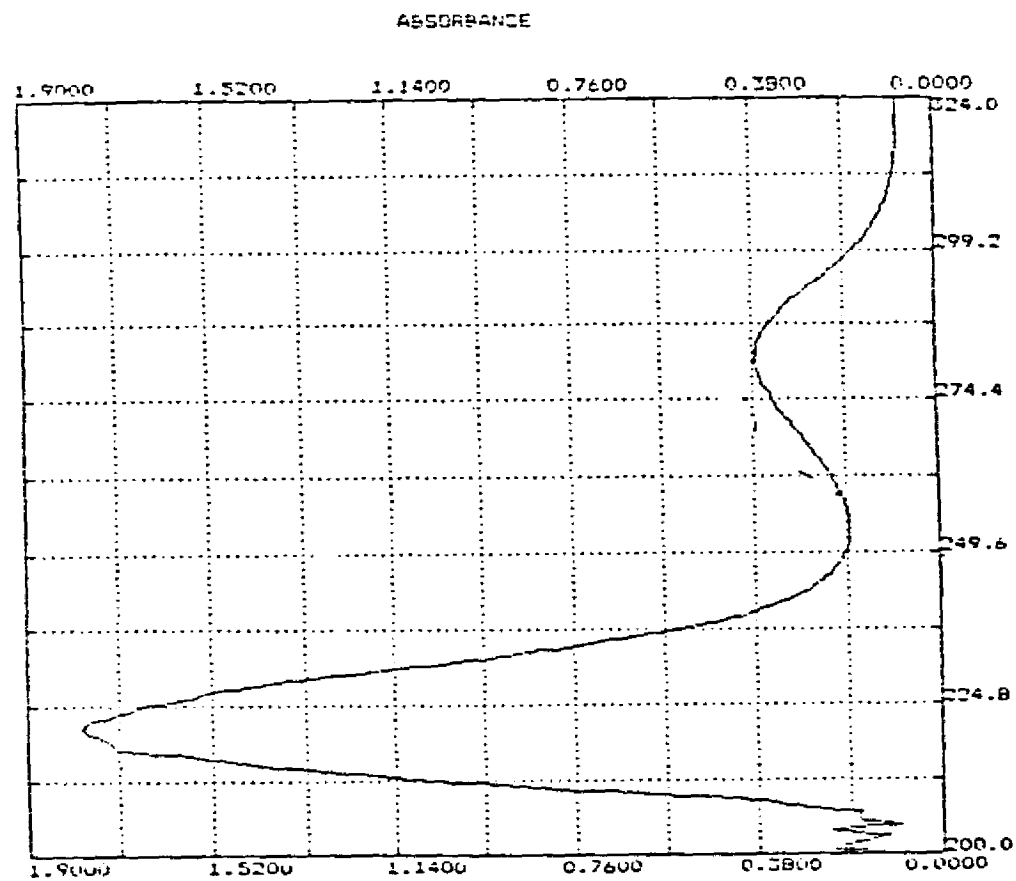


GRAFICA 6.- BARRIDO DE 200 A 324 nm DE LA
FRACCION 5 DE LA CEPAC 89-55



GRAFICA 7.- BARRIDO DE 200 A 324 nm DE LA
FRACCION 6 DE LA CEPAC 89-55

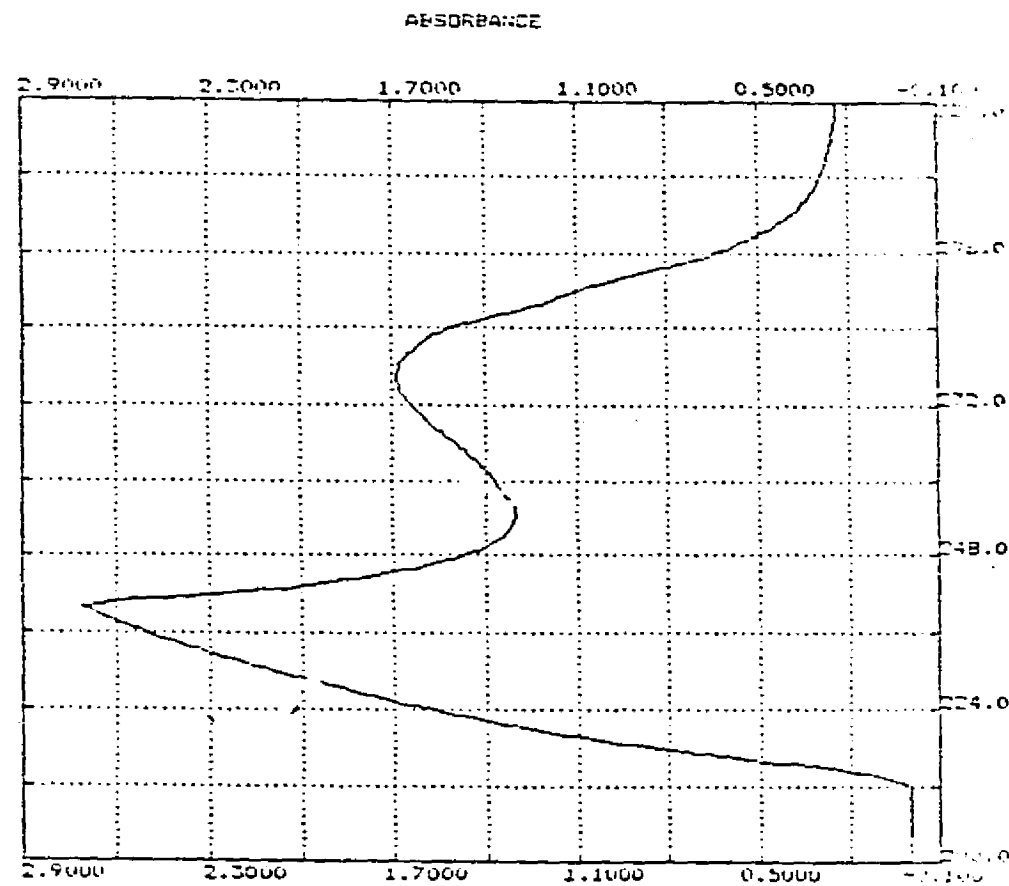
BECKMAN
DU-64 SPECTROPHOTOMETER



Scan Speed: 750 nm/min

GRAFICA 8.- BARRIDO DE 200 A 324 nm DE LA
FRACCION 7 DE LA CEPA 89-55

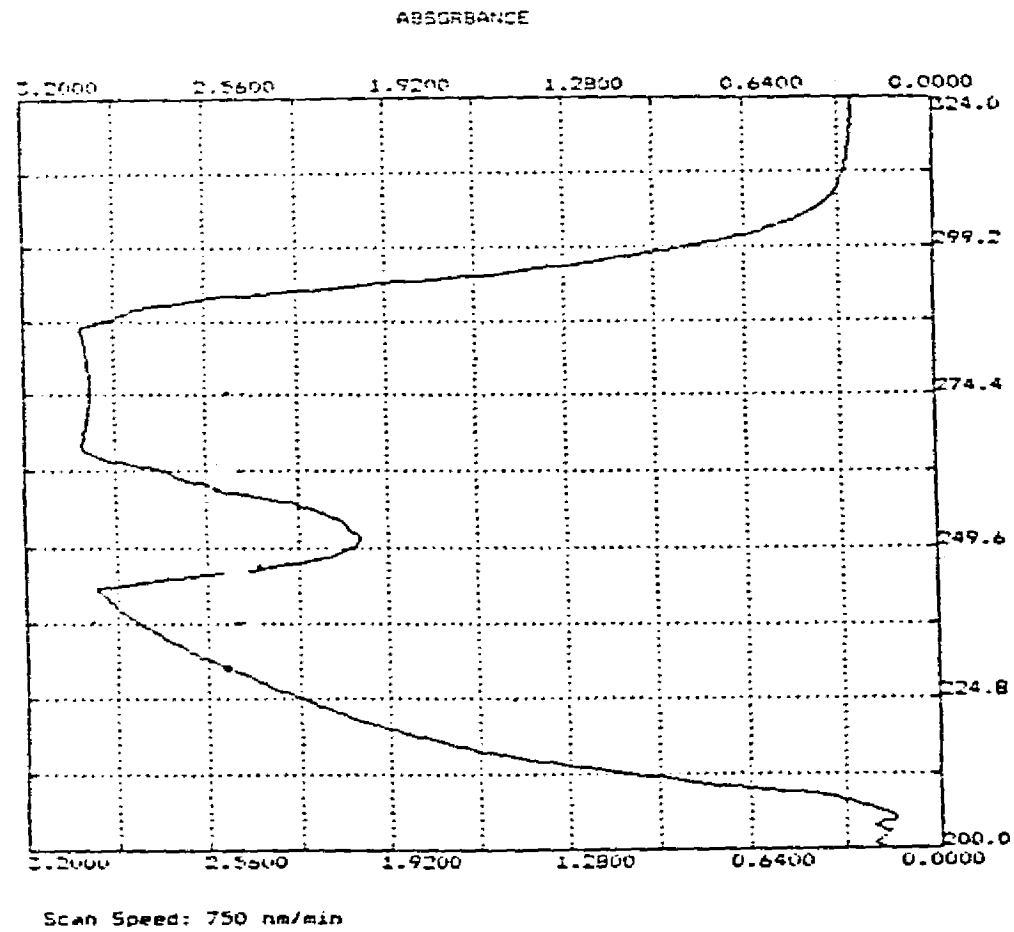
BECKMAN
DU-64 SPECTROPHOTOMETER



Scan Speed: 750 nm/min

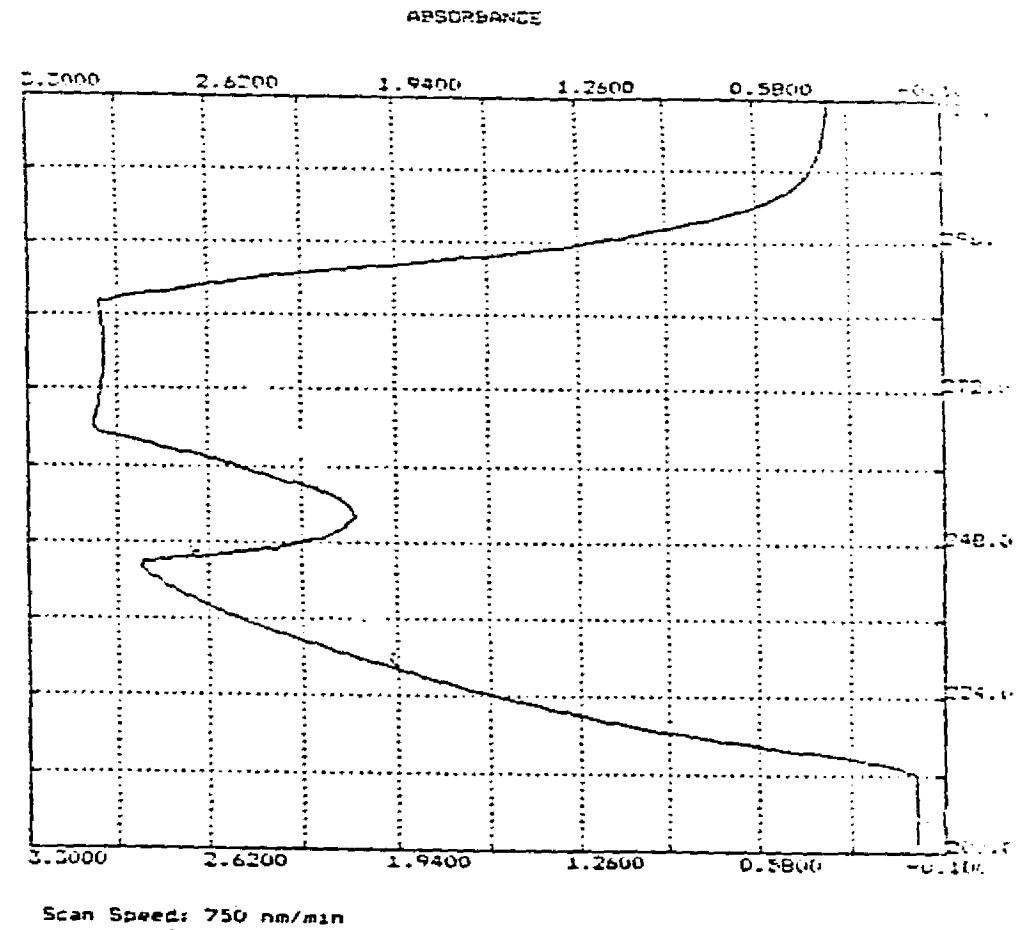
GRAFICA 9.- BARRIDO DE 200 A 324 nm DE LAS
FRACCIONES 8-9 DE LA CEPA 89-55

BECKMAN
DU-64 SPECTROPHOTOMETER



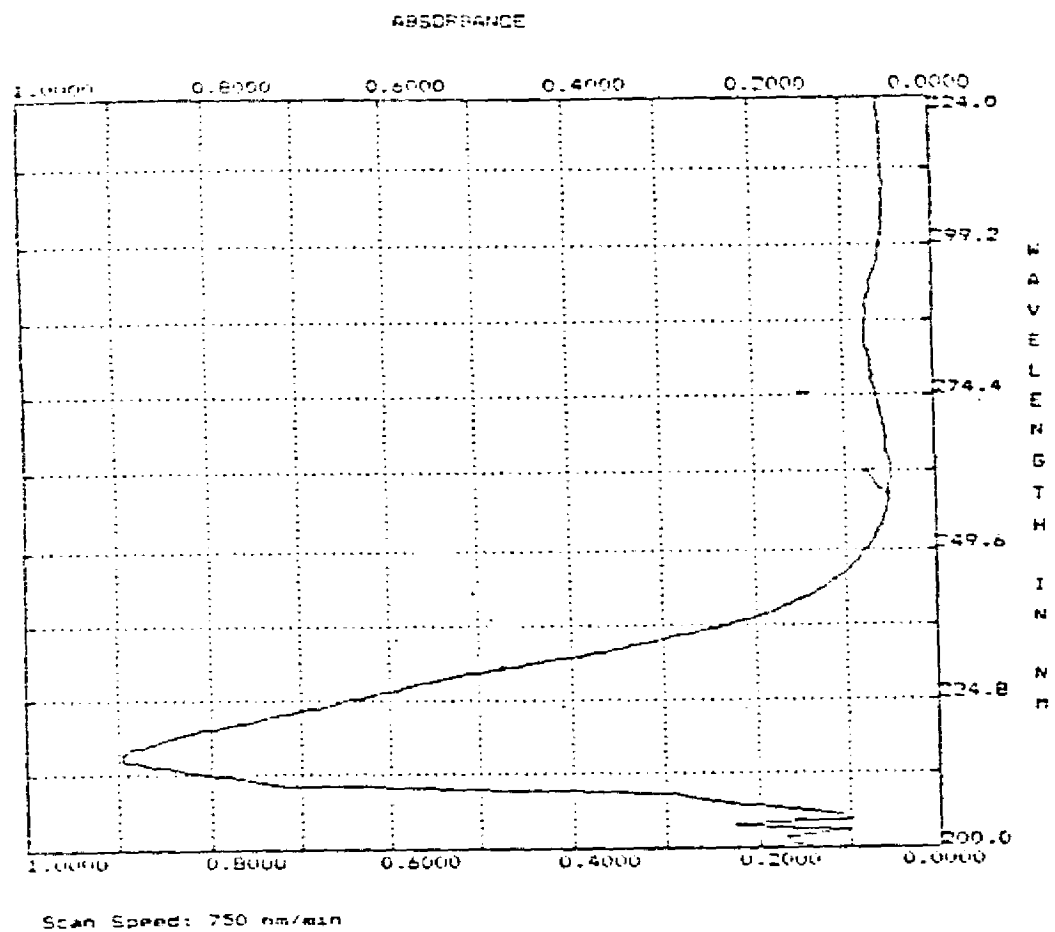
GRAFICA 10.- BARRIDO DE 200 A 324 nm DE LA
FRACCION 10 DE LA CEP 89-55

BECKMAN
DU-64 SPECTROPHOTOMETER



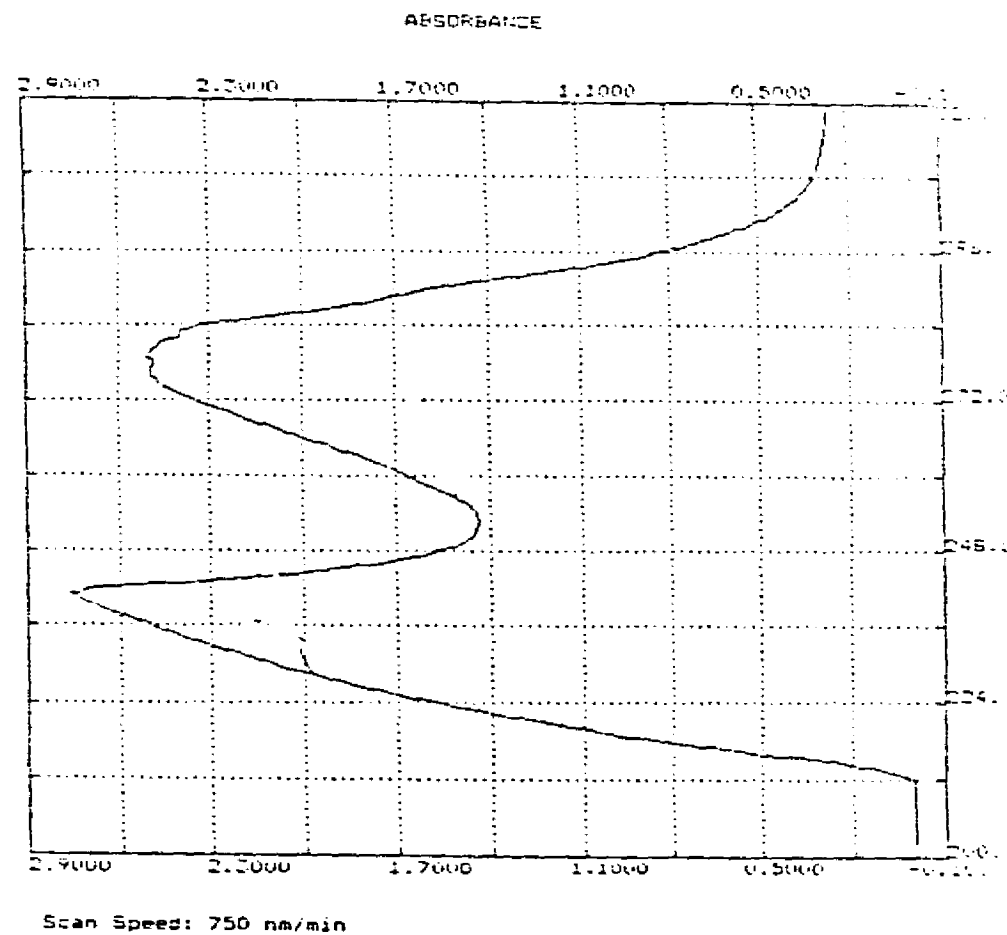
GRAFICA 11.- BARRIDO DE 200 A 324 nm DE LAS
FRACCIONES 10-11 DE LA CEP 89-55

BECKMAN
DU-64 SPECTROPHOTOMETER



GRAFICA 12.- BARRIDO DE 200 A 324 nm DE LA
FRACCION LAV DE LA CEPÁ '89-85

BECKMAN
DU-64 SPECTROPHOTOMETER



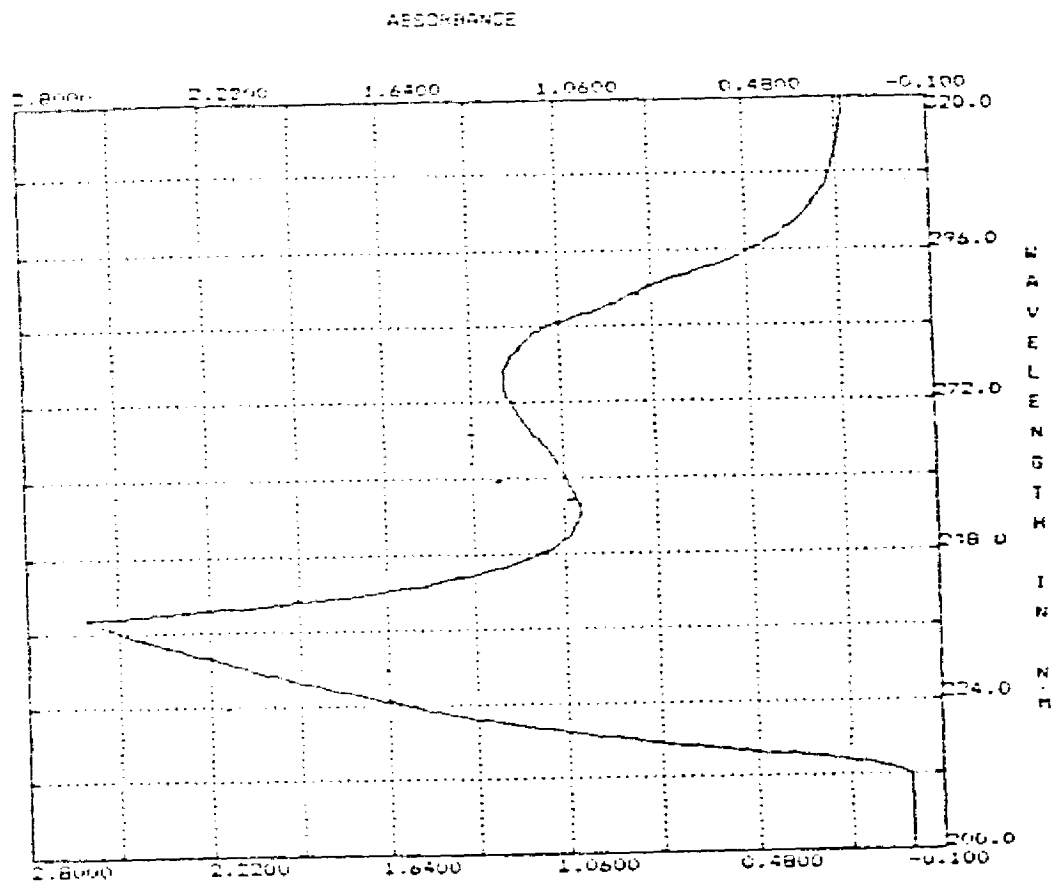
GRAFICA 13.- BARRIDO DE 200 A 324 nm DE LA
FRACCION 8-9 DE LA CEPÁ MINNESOTA

En la misma forma se realizó el estudio para el resto; en y la mayoría de las "cepas" se coincidió en seleccionar las fracciones 8 y 9; esto se observa para la cepa Minnesota (Gráfica 13) , para la cepa PAV-1 (Gráfica 14), para la cepa de campo 89-126 (Gráfica 15), para la cepa PAV-250, (Gráfica 16), para la cepa ALD las fracciones 3-4 (Gráfica 17), también la fracción 9 y 10 (Gráfica 18).

Al mismo tiempo se fueron pesando 100 μ l de cada fracción (72 en total), con lo que se fue calculando su δ =gr/ml, posteriormente estos datos se trataron por medio de una regresión lineal (Cuadro 1 y Gráfica 1; cepa 89-55), de esta manera se fueron obteniendo los coeficientes de correlación para todas las "cepas", como ejemplo se observa la cepa 89-55, ya mencionada anteriormente. Después de tener tanto los datos de la espectroscopia y de densidad, se procedió a graficar las fracciones contra concentraciones de las proteínas y contra la densidad. De esta manera se obtuvieron los siguientes resultados.

La "cepa" 89-55 tuvo BD=1.112, $r=98.6$ y su espectro mostró una "meseta" desde 264.28 nm a 285.71 nm, dos picos bien definidos uno a 243.0 nm y otro a 280.57 nm y dos picos juntos a 239.42 nm. La "cepa" de campo 89-126 tuvo DB de 1.116 g/ml, $r=99.2$, el espectro mostró dos picos, uno a 236 nm y otro a 280.57 nm. La cepa PAV-250 tuvo una BD de 1.124 g/ml, una $r=98.5$ (Gráfica 21), el espectro reveló un pico a 246.80 nm y otro a 282.28 nm. La cepa PAV-1, presentó una BD de 1.134 g/ml, su gradiente una $r=94.5$, el espectro mostró un pico de absorbancia a 242.54 nm y otro a 279.1 nm. En cuanto a la cepa de referencia ALD, esta tuvo una BD de 1.184 g/ml, una $r=94.4$ y el BE reveló una "meseta" desde 255.28 nm a 298.57 nm, un pico a 248 nm y otro a 279.14. La cepa Minnesota, presentó una densidad boyante (DB) de 1.146 g/ml, el gradiente tuvo una correlación $r=83$ y el espectro en UV (EUV), reveló un pico de absorbancia a 245.86 nm tres picos a 284 nm. Los valores de densidad boyante y los máximos de absorbancia registrados en el espectro de ultravioleta de las "cepas" estudiadas en este trabajo se muestran en el Cuadro 3.

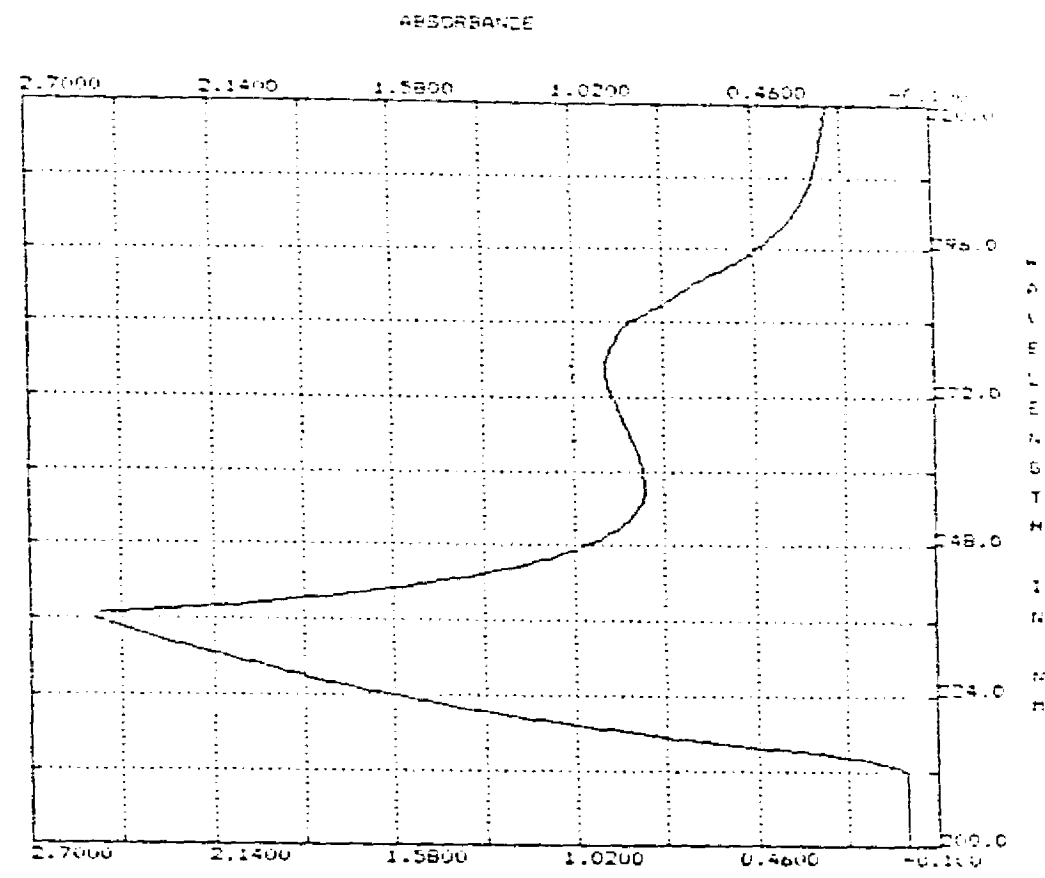
BECKMAN
DU-64 SPECTROPHOTOMETER



Scan Speed: 750 nm/min

GRAFICA 14.- BARRIDO DE 200 A 324 nm DE LA
FRACCION 8-9 DE LA CEPA PAV-1

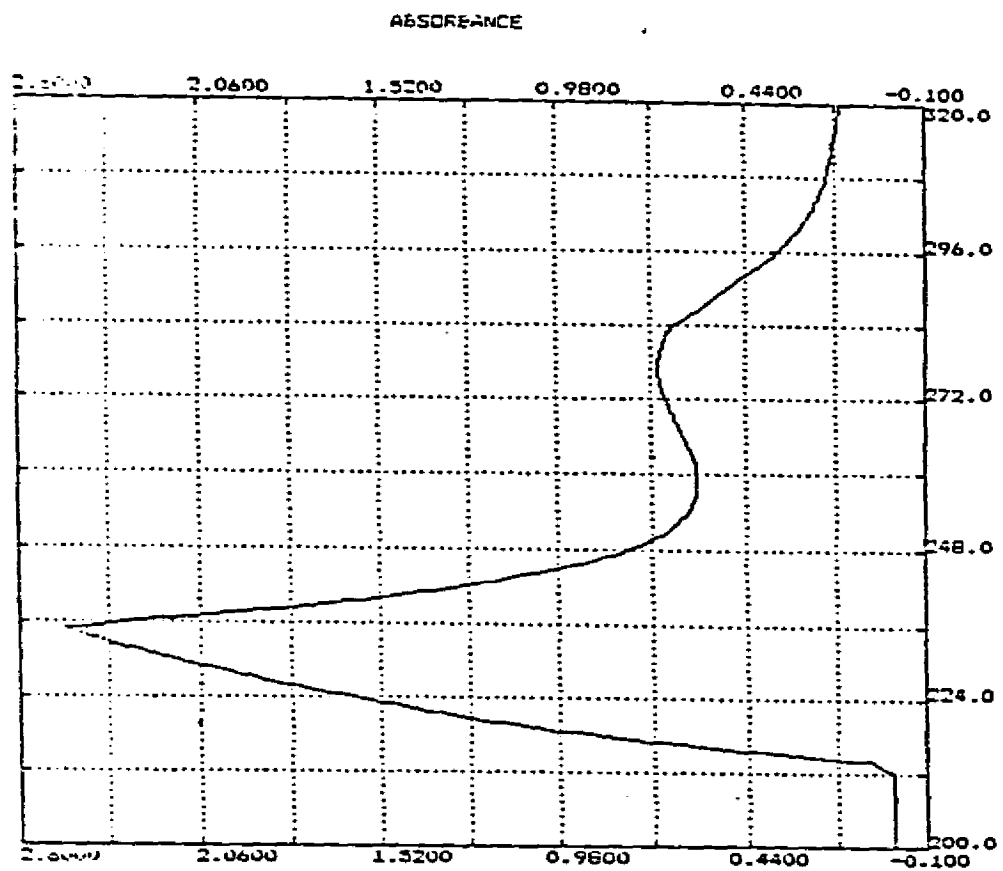
BECKMAN
DU-64 SPECTROPHOTOMETER



Scan Speed: 750 nm/min

GRAFICA 15.- BARRIDO DE 200 A 324 nm DE LA
FRACCION 8-9 DE LA CEPA 89-125

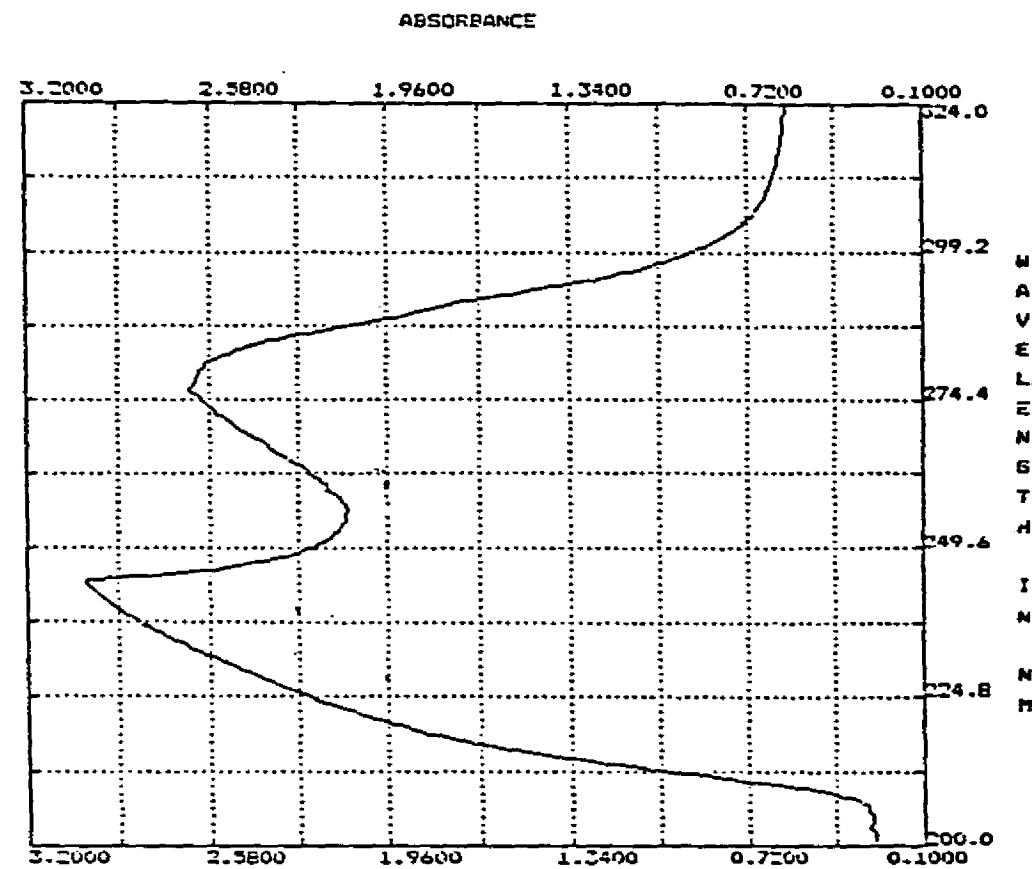
BECKMAN
DU-64 SPECTROPHOTOMETER



Scan Speed: 750 nm/min

GRAFICA 16.- BARRIDO DE 200 A 324 nm DE LA
FRACCION 8-9 DE LA CERA PAV-250

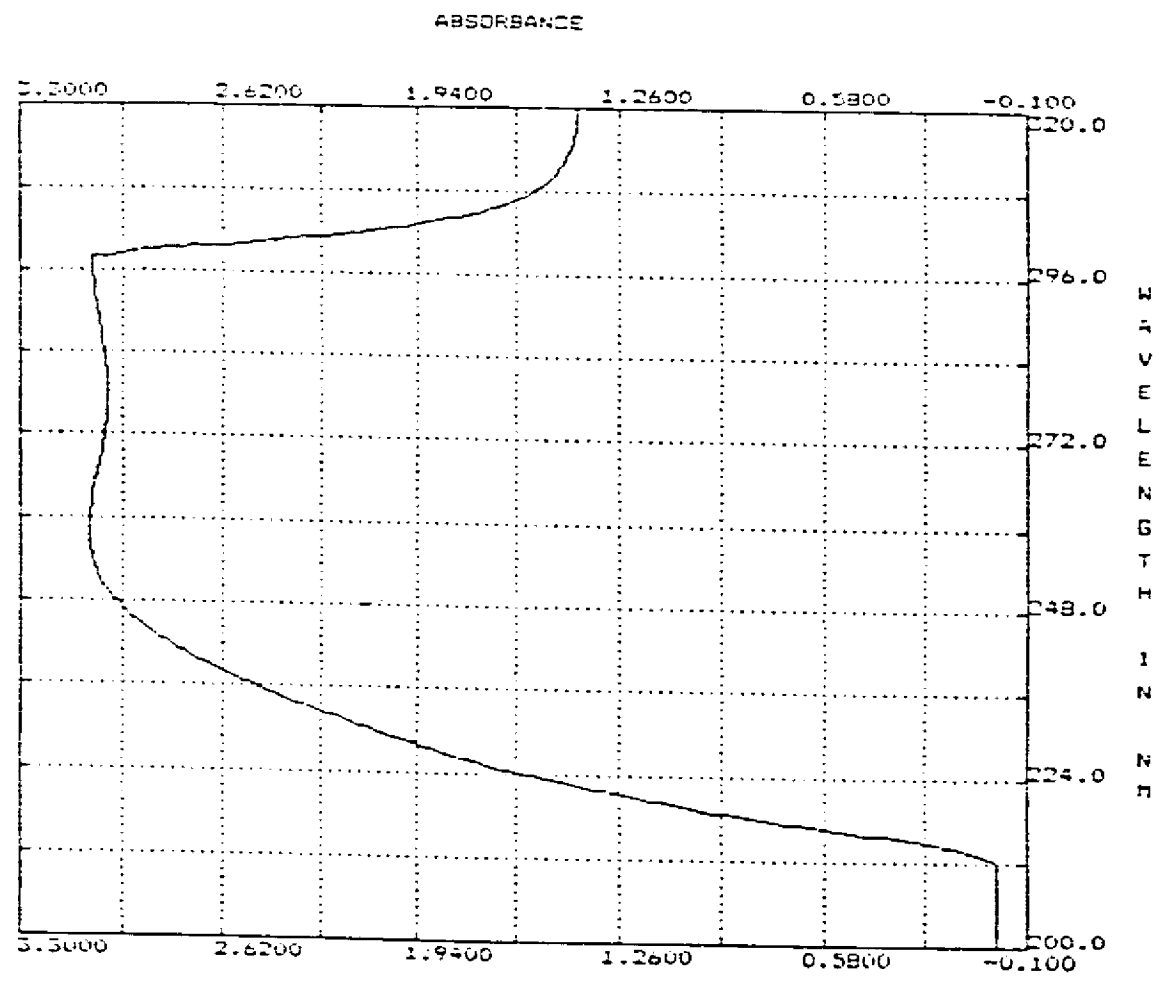
BECKMAN
DU-64 SPECTROPHOTOMETER



Scan Speed: 750 nm/min

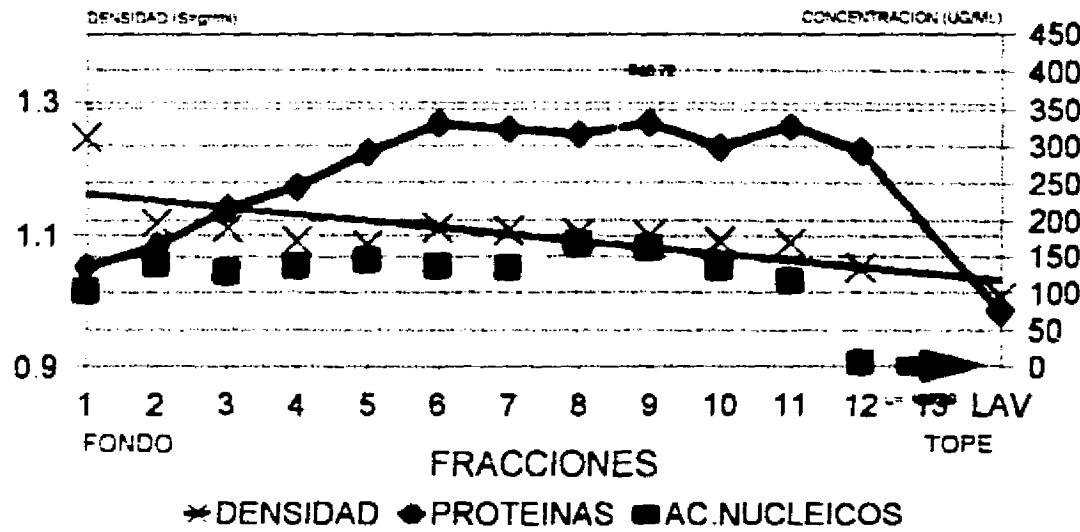
GRAFICA 17.- BARRIDO DE 200 A 324 nm DE LA
FRACCION 3-4 DE LA CERA ALD

BECKMAN
DU-64 SPECTROPHOTOMETER

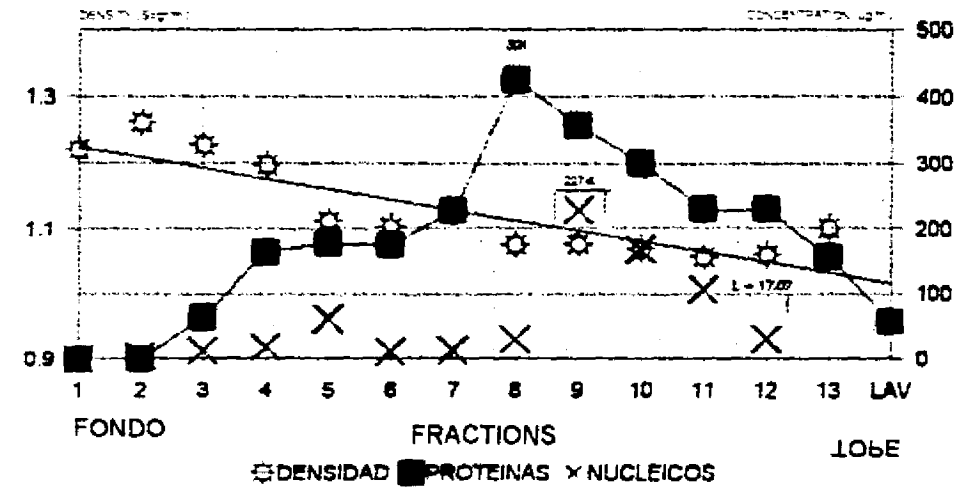


GRAFICA 18.- BARRIDO DE 200 A 324 nm DE LA
FRACCION 9-10 DE LA QEPALD

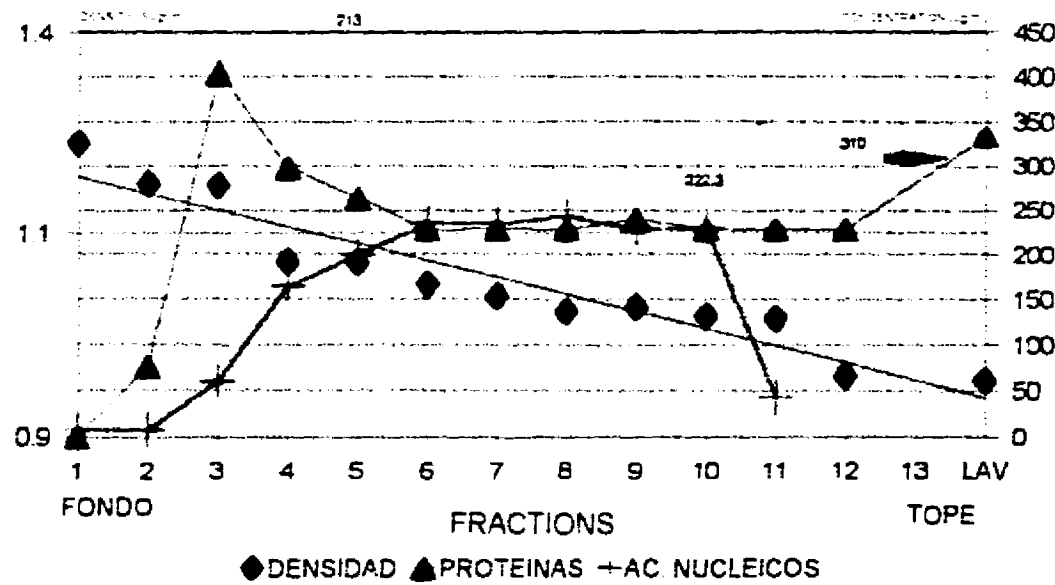
GRAFICA 19. PURIFICACION DE LAS FRACCIONES DE LA CEPA MINNESOTA DEL VFPC



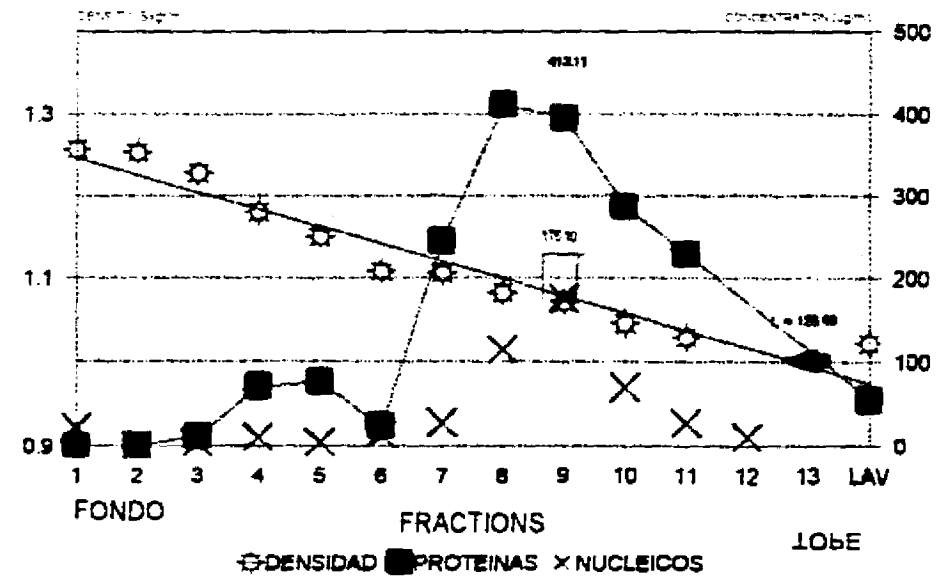
GRAFICA 20. PURIFICACION DE LAS FRACCIONES DE LA CEPA PAV-1 DEL VFPC



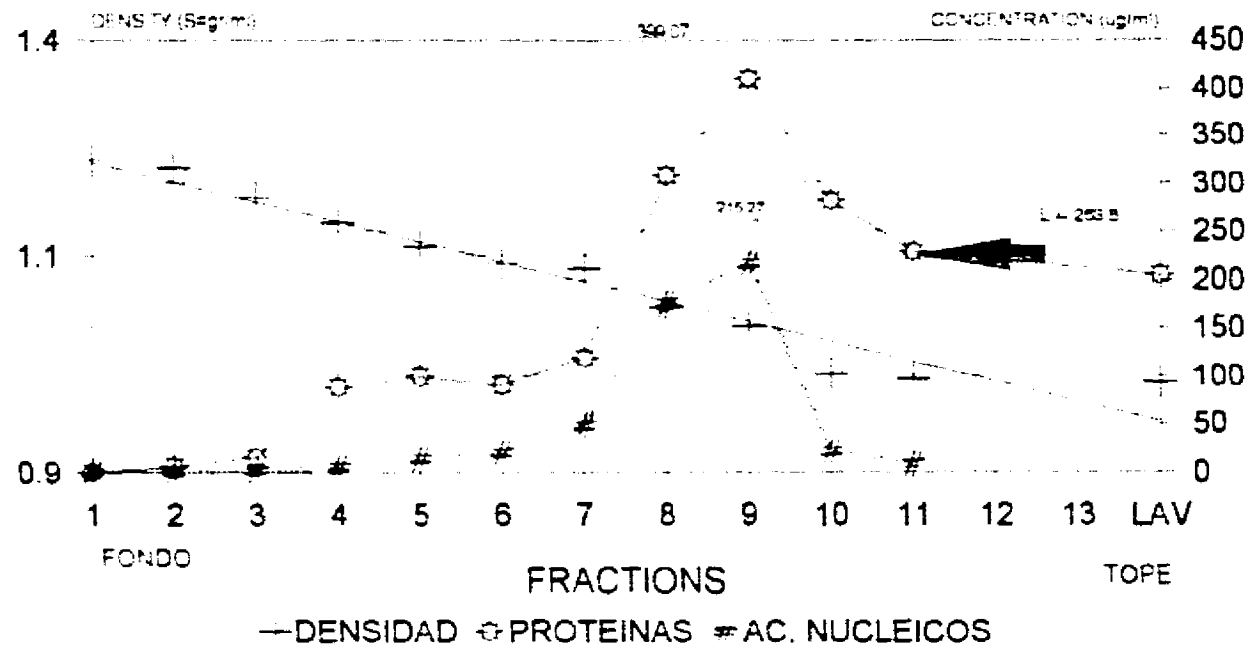
GRAFICA 21. PURIFICACION DE LAS FRACCIONES DE LA CEPA ALD DEL VFPC.



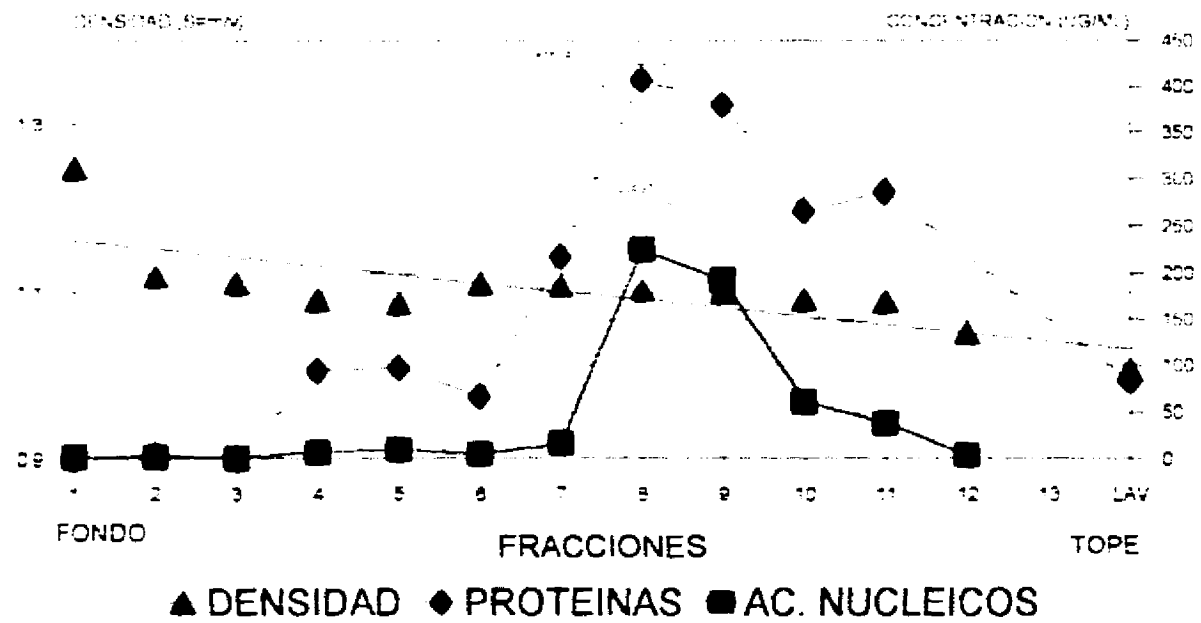
GRAFICA 22. PURIFICACION DE LAS FRACCIONES DE LA CEPA PAV-250 DEL VFPC



GRAFICA 23. PURIFICACION DE LAS FRACCIONES DE LA CEPA 89-126 DEL VFPC



GRAFICA 24. PURIFICACION DE LAS FRACCIONES LA CEPA 89-55 DEL VFPC



5. DISCUSION:

La "cepa" Brescia, purificada a partir de los sobrenadantes de cultivos celulares infectados o de células infectadas, en un gradiente de glicerol/tratrato de Na-K, mostró que la fracción de una densidad boyante de 1.13 - 1.15 g/ml presentaba altos títulos infectantes, mientras que en la fracción de 1.12- 1.14 g/ml presentaba alta afinidad en el ensayo de captura de antígeno (ECA). (Wensvoort *et al.*, 1989).

Con respecto a los resultados en este trabajo el coeficiente y correlación de las regresiones lineales indicó como había penetrado cada "cepa" al gradiente de sacarosa, obteniendo buenos resultados; mostrando así que el gradiente de sacarosa permitió purificar a las 6 "cepas" utilizadas en este estudio.

En este trabajo también se determinó la densidad boyante y se analizaron los espectros de cada una de las "cepas", Se obtuvieron 12 fracciones de cada cepa y se encontró que las fracciones más importantes fueron la 8 y la 9, para las "cepas" vacunales Minnesota, PAV-1, PAV-250, para las "cepas" de campo 89-55 y 89-12, para la cepa de referencia ALD las fracciones importantes fueron 3-4 y 9-10. La "cepa" 89-55 también mostró como fracción importante la 10 y 11 Por otro lado la DB mostró ligeras diferencias entre "cepas", se encontro que las "cepas" de campo mostraron una DB de $1.114 + 0.002$ g/ml; las "cepas" vacunales mostraron una DB un poco mayor $1.135 + 0.011$ g/ml, y la cepa de referencia ALD mostró una DB más elevada de 1.184 g/ml.

La DB puede variar, por interacción del virus, con el gradiente utilizado en la ultracentrifugación. Se sabe que la densidad será indicativa de que tan hidratadas estan las proteínas, debido a la hidrofobicidad que está dada por los aminoácidos y carbohidratos presentes.

La densidad también puede ser afectada porque la membranas están asociadas por tener varios aminoácidos pegados a la cápside interna, y parte transmembranal de la cápside externa, no precisamente como virus envuelto, sino como parte de la cápside, también la densidad puede variar porque los viriones se encuentran más empaquetados o menos empaquetados (Comunicación personal). Por otro lado las centrifugaciones isopícnicas debe hacerse durante 4 a 8 horas y el virus no sigue viajando hacia el fondo por detenerse en donde tiene el gradiente una densidad igual a la del virus, por lo que en este trabajo parece ser una separación por velocidad y las densidades obtenidas son solo indicativas de lo que se vió en estas pruebas. Esta es una razón de las diferencias con los datos publicados por otros autores y otra razón es una variación en las fórmulas de los gradientes empleados. (Comunicación personal).

Los resultados mostraron que las "cepas" de campo presentaron la DB más baja, seguidas de las "cepas" vacunales y finalmente de la cepa de referencia. Esto correlaciona de alguna manera con los datos que comunica Weenvort, 1989, donde se menciona que "cepas" de 1.13-1.15 g/ml presentan altos títulos infectantes y otras presentan de 1.12 - 1.14 g/ml a la prueba de alta afinidad de captura. Esto puede deberse a que las "cepas" altamente infectivas presenten una DB más alta por estar más "activas", mientras que las vacunales se encuentran atenuadas con una DB mediana y baja con las "cepas" de campo, que deberían ser infectivas y quizá con un DB más alto. También debe tomarse en cuenta que los holandeses trabajaron con una sola cepa que fue la BRESCIA y con sus fracciones que purificaron; siendo esta cepa de referencia y por lo tanto más infectiva. Lo que es totalmente diferente a los resultados obtenidos, porque en este capítulo se trabajaron con 6 "cepas" diferentes y con sus 2 fracciones purificadas (8 y 9), utilizando diferentes tipos de "cepas" (vacunales: Minnesota; PAV-1; PAV-250, de campo 89-55, 89-126 y de referencia: ALD).

Los espectros mostraron que todas las "cepas" presentaron los picos de absorbancia a 240 y 280 nm, los cuales corresponden a las absorbancias de los aminoácidos aromáticos de las proteínas y a los ácidos nucleicos respectivamente.

En cuanto al análisis de fracciones, Wensvoot *et al.*, (1989) encontraron siete fracciones individuales presentes en estos dos "picos". Las primeras tres fracciones que pertenecieron al pico de alta infectividad sólo se encontraron en la gp54 y la gp51; mientras que en las otras fracciones con altas señales (afinidad) del ECA y baja infectividad, revelaron sólo la gp31.

Cuando la purificación fue hecha con lisado de células infectadas, encontraron que en la gp31 estaba asociada más con las fracciones de alta ECA, con densidades de 1.12-1.14 g/ml, que con las fracciones de alta infectividad, que tenían densidades de 1.14 g/ml. Como la prueba de ECA específicamente detecta E1, estos hallazgos sugieren que la mayoría del detectado en el pico de ECA correspondes a viriones unidos en forma no estructural, pero sí como un complejo con la gp31. Posiblemente estas densidades del complejo gp31-E1 están unidas a las membranas de la célula hospedadoras y no incorporada en el virión. Estos resultados concuerdan con los hallazgos de Laude (1977), relativos a que los viriones del VFPC, purificados por gradiente se encontraron fuertemente contaminados por componentes celulares. Otra posible explicación puede ser que la gp31 se encuentra únicamente en viriones inmaduros, en el mismo sentido como proteína pre-M de los Flavivirus (Westawey, 1985). Con los resultados obtenidos no se puede decir todavía si está relacionado a la gp31 o la E1; al analizar las corridas en geles de policrilamida se llevaron a cabo en el Capítulo 5 muy probablemente se encuentre una explicación más amplia a todo esto, lo cual se discutirán en la parte final de esta Tesis.

Finalmente, el estudio que se realizó por Espectro en luz Ultravioleta, con las fracciones de todas las "cepas", donde se les realizó un barrido de espectro de 200 a 320 nm, obteniendo de cada "cepa" su gráfica, permitió obtener un perfil representativo de cada una, lograndose seleccionar las fracciones más importantes, lo cual proporcionó información selectiva, que permitió seguir con el siguiente estudio, esta técnica nos permitió tener una buena selección, lo cual se comprobó en el siguiente Capítulo.

7. BIBLIOGRAFIA

Bloemraad, M. (1989). Detection and differentiation of pestiviruses isolated from pigs in the framework of Hog Cholera diagnosis. Laboratory manual of diagnostic procedures for Hog Cholera Classical Swine Fever). Central Veterinary Institute. Lelystad, The Netherlands.

Bruner, W.D., Gillespie, H.J., (1973). Hog Cholera. Hagan's infectious diseases of domestic animals. Sixth Edition. Comstock Publishing Associates. Cornell University Press. pp 1266-1283.

Cotral, E. G. (1978). Togavirus Manual of standardized methods for Veterinary Microbiology. Comstock Publishing Associates. Cornell University Press pp 311-314.

Donis, O.R. & Dubovi, E.J. (1978). Glycoproteins of Bovine Diarrhoea Virus-Mucosal Disease virus in infected bovine cells. Journal of General Virology 68, 1607-1616.

Dubois, M., Giles, K.A., Hamilton, J.K., Rbers, P.A. (1956). Cuantificación de carbohidratos con reactivo de fenol-ácido sulfúrico. Anal. Chem. 28, 350.

Kalb, V.f., and Bernlohr, R.W., (1977) "A new spectrophotometric assay for proteins in cell extracts". Anal Biochem. 82 pp 362-371.

Mendoza, E.S., Correa, G.P., Hernández-Baumgarten, E., y Ciprián, C.A. (1992). Perspectiva de un Método de Diagnostico Serológico rápido para Fiebre Porcina Clásica. I. XXI congreso Nacional AMVEC 1992, Acapulco, Gro., México.

Mendoza, E.S., Agilera, E., Colmenares, G., Hernández-Baumgarten, E., y Ciprián, C.A. (1994) Analysis of bouyante density and ultraviolet of Hog Cholera strains. 13th Inter. Procc. Vet. Soc. Cong. Bangkok, Thailand, p. 85.

Oirschot Van J.T. (1986). Hog Cholera Diseases of swine Ed. Leman, A.D., Straw, B., Glock, R.d., Mengeling, L.W., Penny, R.H.C., Scholl, E, Sixth Edition. Iowa State University Press. pp 289-300.

Purchio, a.F., Larson, R. y Collett, M. (1984) characterization of Bovine Viral Diarrhea virus proteins. Journal of Virology. Vol. 50: 29 pp. 666-669.

Terpstra, C; Bloemradd, M. and Gielens, A.L.(1984). The neutralizing peroxidase-linked assay for detection of monoclonal antibodies. in Epitopes on structural proteins of Hog Cholerae (Swine Fever) virus. Thesis. p. 41-50.

Thiel, H.J., Stark, R., Weiland, E. & Meyers, G. (1991). Hog Cholera Virus: Molecular composition of virions from a pestivirus. Journal of virology, 65:9, 4705-4512.

Wensvoort, G., C.Terpstra, E.P de Kluyver, C. Kragten, J.C. Warnaar. (1989). Characterization of pestivirus strains with monoclonal against Hog Cholera Virus., in Epitopes on structural proteins of Hog Cholerae (Swine Fever) virus. Thesis. p.41-50.

Wensvoort, G. Terpstra, C., Boonstra, J., Bloemraad, M. and Van Zaane, D. (1986). Production of monoclonal antibodies against Swine Fever virus and their use in laboratory diagnosis. Veterinary Microbiology . 17, 129-140.

Wensvoort, G. (1989) Epitopes on structural proteins of Hog Cholera (Swine Fever) virus.

Westaway E.G., Brinton, M.A., Gaidamovich S., A. Horzinek M.C. Igarashi. Flaviviridae. Intervirology 24:125-139.

CAPITULO 4

ESTUDIO POR MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION DE LAS FRACCIONES PURIFICADAS DE VARIAS CEPAS DE VFPC

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de partículas virales por microscopía electrónica en las fracciones correspondientes a los picos determinados por el espectro en U.V. Se utilizaron seis "cepas" en total, tres "cepas" vacunales: "cepa" Minnesota, "cepa" PAV-1 y "cepa" PAV-250; una "cepa" de referencia: ALD; y las "cepa"s de campo: 89-126 y 89-55. Se realizó la técnica de Tinción negativa: cada muestra se fijó con glutaraldehído y se tiñió con ácido fosfotúngstico y se observó al microscopio electrónico de transmisión. Las fracciones más importantes obtenidas, que correspondieron a los picos de absorbancia de los aminoácidos y proteínas que fueron la 8 y 9 para la mayoría de las "cepas". En las fracciones del gradiente: la "cepa" Minnesota, que tuvo absorbancia a 245.86 nm, en los otros tres "picos" de absorbancia 284 nm, que pertenecieron a la fracción 8 y 9 del gradiente, se observaron partículas virales; La fracción 8 y 9 de "cepa" PAV-1, que presentó absorbancia a 242.54 nm y otra a 279.71 nm, se pudieron observar partículas virales. La "cepa" PAV-250 tuvo una fracción que absorbe a 246.20 nm y otra a 282.28 nm, en ambas se observaron partículas virales; La "cepa" de referencia ALD, que presentó en la fracción 9 y 10, con tres picos con absorbancia 255.28 a 298.57 nm, se observaron partículas virales. Las "cepas" de campo 89-126 y 89-55 mostraron en una con el BE un fracción de 236 y otro de 280.57; mientras que la otra el BE reveló una "meseta" de 264.28 a 298.57, dos "picos" de 243.07, de 280.57 y dos de 239.42, observándose virus en la fracciones 8 y 9. Se determinaron partículas completas, en fase de destrucción, observándose péplomeros alrededor del núcleo, ya que la envoltura está fuertemente adherida a la cápside, toda la partícula se observó con un perfil icosaédrico aparente. Estas partículas solo se observaron en las fracciones 8 y 9 de la "cepa"s vacunales: Minnesota, PAV-1, PAV-250, y de las de campo: 89-126 y 89-55, y en la fracción 9 y 10 de la "cepa" de referencia ALD. La técnica que se utilizó para visualizar las partículas fue la tinción negativa, observándose partículas virales completas, incompletas y péplomeros.

SUMMARY

The objective of this work was to determine the presence of viral particles through electron microscopy of the corresponding fractions from UV peaks. Wensvoort et al. purified the Brescia strain of Hog Cholerae virus (HCV) in Na-K glycerol/tartrate gradient and found a fraction 1.14 +/-1 g/ml of bouyant density with high level of infectant titres, and a fractions of 1.13+/-1 g/ml that had high affinity in the antigen capture assay (ACA); however, they could not find viral infectant particles under electron microscopy in corresponding fractions. A preceding work research (Mendoza *et al*, 1993) showed UV spectrum peaks of field, vaccine, and reference HCV "strains". Six HCV "strains" were analyzed, three vaccine "strains": Minnesota, PAV-1 and PAV-250; one reference strain: ALD; and two field "strains": 89-126 and 89-55. All samples were fixed with glutaraldehyde, stained with phosphotungstic acid, and observed under a transmission electron microscope. For the Minnesota strain, the three peaks of 284 nm from the 8 and 9 gradient fractions showed viral particles; the fractions 8 and 9 from PAV-1 strain, with absorbance peaks of 242.54 and 282.2879.91 nm had viral particles; the PAV-250 strain that had two peaks of 246.20 and 282.28 nm, both had observable viral particles. The reference strain (ALD), that showed three absorbance peaks from 255.28 to 298.57 nm in fractions 9 and 10, had also viral particles. The field "strains" 89-126 and 89-55, had observable viral particles in gradient fractions 8 y 9. All particles found were complete, in destruction phase, with peplomers surrounding the nucleus, because the envelope is strongly attached to the capsid, having an apparent icosahedric profile. This particles were only observed in fractions 8 y 9 of vaccine and field "strains". For the reference strain ALD, particles were observed in fractions 9 and 10.

1. INTRODUCCION

Los holandeses (Wensvoort y cols, 1989) cuando purificaron la "cepa" Brescia en gradientes de glicerol/tartrato de Na-K, encontraron que la fracción de una densidad boyante de 1.14 ± 1 g/ml presentaba altos títulos infectantes, mientras que en la fracción de 1.13 ± 1 g/ml presentaba alta afinidad en el ensayo de captura de antígeno (ECA), sin embargo no observaron la presencia de partículas virales por microscopía electrónica en las fracciones correspondientes.

El VFPC mide aproximadamente de diámetro de 40 a 50 nm con una nucleop cápside de 29 nm. Es un virus RNA envuelto, la membrana alrededor le da la estructura icosaédrica, han sido demostradas proyecciones parecidas a flecos de 6 a 8 nm sobre la superficie del virión. La densidad boyante dependerá del material que se utilice para el gradiente y sobre las células en las que ha sido propagadas el virus, la densidad ha sido reportada desde 1.12 hasta 1.178 g/ml. Con valores en su coeficiente de sedimentación de 140-180 S (Horzinek, 1981).

En el trabajo precedente a este estudio, se mostraron los espectros de las "cepa"s de FPC observandose que todas presentan los picos de absorbancia a 240 y 280 nm, sin embargo las "cepa"s ALD y la 89-55 presentaron otros picos de absorbancia.

Los espectros en ultravioleta de las fracciones de las "cepa"s en estudio mostraron que la "cepa" Minnesota, tuvo un espectro en UV de que reveló un pico a 245.86 nm y tres picos a 284 nm; la "cepa" PAV-1, presentó un espectro que reveló un pico a 242.54 nm y otro a 279.71; mientras que con la "cepa" PAV-250 se reveló un pico a 246.28 nm y otro a 282.28 nm. En cuanto a la "cepa" de referencia ALD, ésta tuvo un espectro que reveló una "meseta" desde 255.28 a 298.57 nm, un pico a 248 nm y otro a 279.14 nm. La "cepa" de campo 89-126 presentó un pico a 236 nm y otro a 280.57 nm; la "cepa" de campo 89-55 tuvo una "meseta" de 264.28 a 285.71, un "pico" a la 243.07 y otro a de 280.57 y dos de 239.42, respectivamente.

Los estudios de Microscopía Electrónica realizados por Van Oirschot (1980), sugirieron que los virus maduros están sobre la membrana introcitoplasmática, esto es apoyado por la falta de habilidad de detectar antígenos de VFPC sobre la superficie de las células infectadas, por lo menos dada la sensibilidad del ensayo empleado por este autor .

2. 0. OBJETIVO PARTICULAR

Determinar la presencia de partículas virales por microscopía electrónica en las fracciones correspondientes a los picos previamente determinados por el espectro en UV.

3.0. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. "CEPAS"

Se utilizaron las fracciones del gradiente siguientes: de la "cepa" Minnesota, la que tuvo absorbancia a 245.86 nm, y los otros tres "picos" con absorbancia a 284 nm, que pertenecieron a las fracciones 8 y 9 del gradiente; Las fracciones 8 y 9 de la "cepa" PAV-1, que presentaron absorbancia a 242.54 nm y 279.71 nm; de la "cepa" PAV-250, una fracción que absorbe a 246.20 nm y otra a 282.28 nm; de la "cepa" de referencia ALD, la que se presentó en la fracción 9 y 10, con tres picos con absorbancia de 255.28 a 298.57 nm; de las "cepas" de campo 89-126 y 89-55 las fracciones de 236 y de 280.57 de la primera así como la "meseta" de 264.28 a 285.71, los "picos" de 243.07 y de 280.57 y los dos de 239.42.

3.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Se utilizaron las fracciones de las seis "cepas" en total, tres "cepas" vacunales: Minnesota, PAV-1 y PAV-250; una "cepa" de referencia: ALD; y las "cepa"s de campo: 89-126 y 89-55, todas ellas obtenidas por gradiente de sacarosa.

3.2.1. ABSORCIÓN Y TINCIÓN

Cada fracción fue adsorbida a rejillas previamente preparadas con membranas de "fomvar" y carbón durante 5 mins, posteriormente fueron teñidas con ácido fosfotúngstico al 1% en buffer de fosfatos pH 7.2 a 0.2M, durante 5 minutos.

3.2.2. OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO.

Las rejillas se observaron en el Microscopio Electrónico de Transmisión Modelo JEOL JEM-100-S.

4.0. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El Cuadro 1, nos permite observar los resultados obtenidos en los estudios anteriores y las fracciones con las que se trabajaron, también se observan los resultados totales de los diferentes estudios realizados con las 6 "cepas", mostrando partículas virales en las fracciones importantes.

En la Figura 1, se observan partículas virales que se asemejan a las del VFPC la "cepa" de campo 89-55, a un aumento de 25,000.

En la Figura 2, se observan partículas virales indicativas del VFPC, obtenidas de la fracción 9 y 10 de la "cepa" ALD, con un aumento de 25,000.

En la Figura 3, se observan partículas virales y peplómeros, de la "cepa" de campo 89-126 detectadas en la fracción 8 y 9 a un aumento de 25,000.

En la Figura 4, se observa una partícula viral de la "cepa" PAV-1, a un aumento de 25,000.

Con respecto a los resultados de Microscopía Electrónica de las fracciones del gradiente: la "cepa" Minnesota, tanto en la absorbancia de 246.72 nm, como en los otros tres "picos" de absorbancia de 284 nm, que pertenecieron a las fracciones 8 y 9 del gradiente, se observaron partículas virales; en las fracciones 8 y 9 de la "cepa" PAV-1, que presentaron absorbancia a 242.54 nm y con 279.71 nm, se pudieron observar partículas virales; la "cepa" PAV-250 tuvo dos fracciones que absorbieron a 246.28 nm y a 282.28 nm y en ambas se observaron partículas virales; con la "cepa" de referencia ALD en la fracción 9 presentó una meseta de 255.28 a 298.57 nm, y en la fracción 3 y 4 un pico de 248 y otro de 279.14, donde

CUADRO 1.- CARACTERÍSTICAS DE LAS SEIS "CEPAS" SELECCIONADAS DEL VFPC DE LOS ESTUDIOS ANTERIORES Y RESULTADOS DE LA MICROSCOPIA ELECTRONICA

"CEPA"	IF	IP	AcMa Y P	AcMa FPC	FRACC	PROT	DB δ gr/ml 1.12-1.15	r	ESPECTRO ABS (λ)	M.E.
MINNESOTA	10 ^{6.24}	10 ^{6.4}	BVD (-) BD (-)	5,6,8, 13d	8 Y 9	246.72	1.146	83	1 PICO 245.86 3 PICO 284	(+)
PAV-1	10 ^{6.28}	10 ^{7.24}	BVD (-) BD (-)	5,6,8W,13 d	8 Y 9	331.00	1.134	94.5	1 PICO 242.54 1 PICO 279.71	(+)
89-126	10 ^{7.24}	10 ^{7.71}	BVD (-) BD (-)	6,8	8 Y 9	399.07	1.116	99.2	1 PICO 236 1 PICO 280.57	(+)
89-55	10 ^{7.28}	10 ^{7.28}	BVD (-) BD (-)	6,8	8 Y 9 10 Y 11	369.03 186.74	1.112	98.6	F8 1 PICO 243.07 1 PICO 280.57 F10 2 PICO 239.42 1 MESETA 264.28-285.71	(+)
PAV-250	10 ^{6.28}	10 ^{6.28}	BVD (-) BD (-)	6	8 Y 9	413.11	1.124	98.5	1 PICO 246.28 1 PICO 282.28	(+)
ALD	10 ^{6.23}	10 ^{6.4}	BVD (-) BD (-)	5,6,8	3 Y 4 9 Y 10	213.72 222.31	1.184	94.4	F9 1 MESETA 255.28-298.57 F3 1 PICO 248 1 PICO 279.14	(+)

IF= Inmunofluorescencia IP=Inmunoperoxidasa AcMa=Anticuerpo Monoclonal; P=Policlinal; δ=Reacción débil, FRACC=Fracción; Prot=Proteínas, DB=Densidad Boyant; r=Regresión Lineal F=Fracción λ= Longitud de onda; M.E.=Microscopía Electrónica; (+)= Partículas virales

se observaron partículas virales. Las fracciones 8 la "cepa" de Campo 89-126 mostró un pico de 236 y otro de 280.57; mientras que en la fracción 10 de la "cepa" de campo 89-55 presentó una "meseta" de 264.28-285.71 y un pico de 239.42, observándose partículas virales.

En este estudio se encontraron partículas completas, en fase de destrucción, observándose peplómeros alrededor del núcleo, ya que la envoltura está fuertemente adherida a la capsida, toda la partícula se observó con una forma icosaédrica aparente. Estas partículas sólo se observaron en las fracciones 8 y 9 de las "cepas" vacunales: Minnesota, PAV-1, PAV-250, en las de campo: 89-126 y 89-55, y en la fracción 9 y 10 de la "cepa" de referencia ALD, esto se puede observar en las Figuras 1,2,3,4.

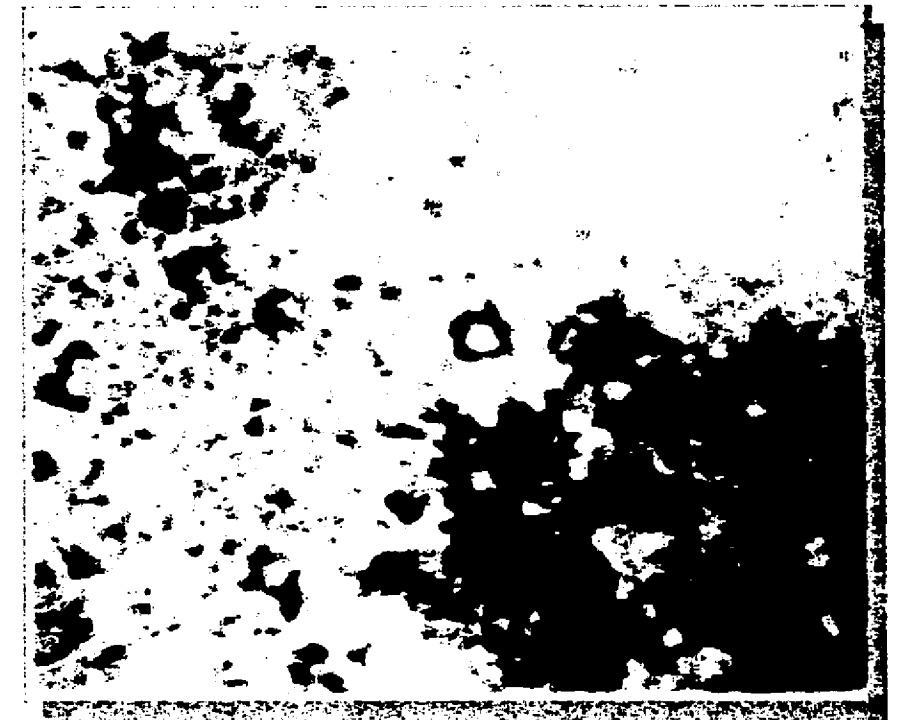
Con respecto a los estudios realizados por Wenvoort (1989), quien trabajó con gradientes de ultracentrifugación con tatrato de sodio y sacarosa, donde reporta que obtuvieron 60 fracciones, de las cuales, 52 de las 60 resultaron ser positivas a la prueba de infectividad, por la técnica de captura de antígeno; además de analizar estos picos por el método de PAGE-SDS, se encontró que correspondieron a proteínas importantes, tales como 54K, 51K y 31K demostrándose que son glicoproteínas; Wenvoort y cols., en este estudio no realizaron trabajos con Microscopía Electrónica con las fracciones obtenidas. Con respecto a las DB sus resultados fueron de 1.13-1.15 g/ml, para las de alto título de infectividad de 1.12 a 1.14 g/ml, para las de títulos en el ECA, mientras los de los holandeses bajaron solamente con la "cepa" BRESCIA.

ESTUDIO DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISION



FIGURA 1. SE PUEDEN OBSERVAR CON FLECHAS PARTICULAS VIRALES SOSPECHOSAS DEL VFPC DE LA "CEPA" "DE CAMPO 89-55 AUN AUMENTO DE 25,000

FIGURA 2. SE OBSERVAN LAS FLECHAS QUE MARCAN PARTICULAS VIRALES INDICATIVAS DEL VFPC DE LA FRACCION 8 Y 9 DE LA "CEPA" ALD A UN AUMENTO DE 25,000.



ESTUDIO DE MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION

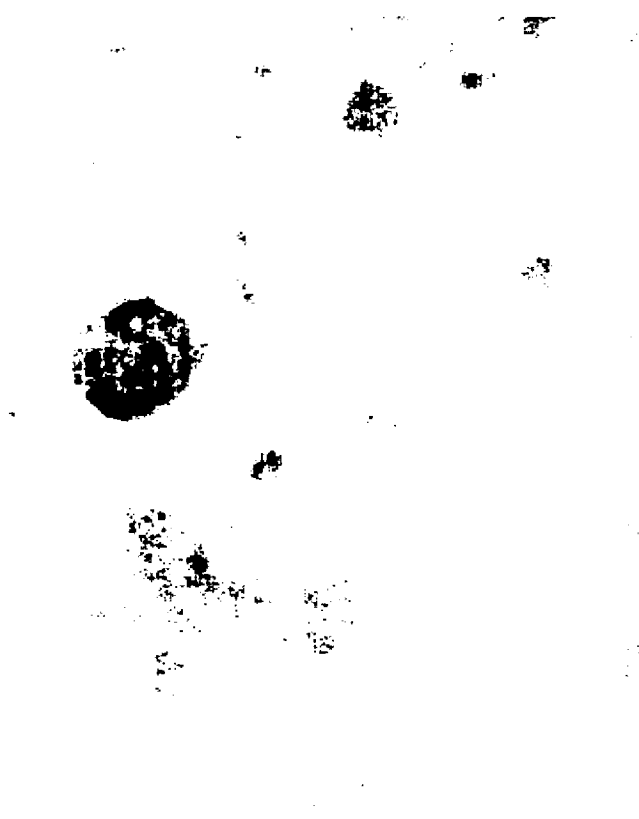
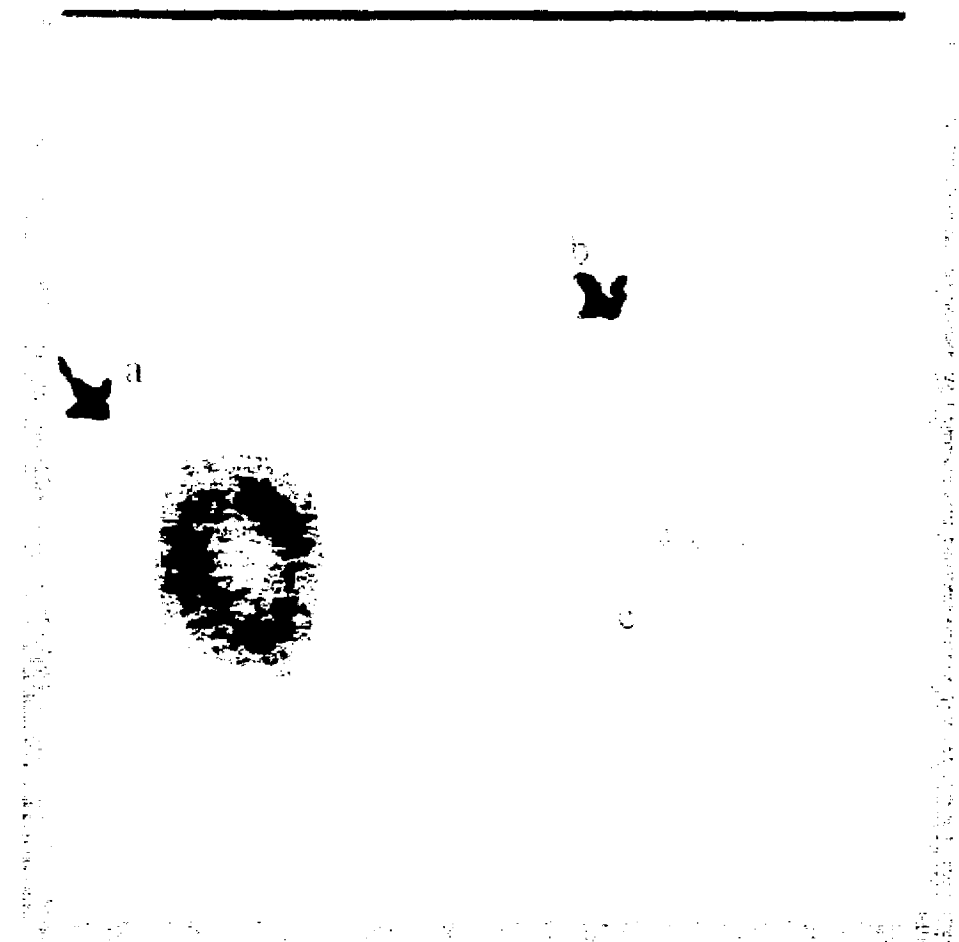


FIGURA 4
A) VIRUS COMPLETO DE APROX 100 NM
B) CAPSIDE VIRAL DE APROX 70 NM
C) PEPLOMEROS SUETOS

FIGURA 3. PARTICULAS INTACTAS NO PENETRADAS POR EL ACIDO OSIOTETINICO, POR LO QUE LA FUNCION EN SUPERFICIAL OBSERVANDOSE PEPLOMEROS



En este estudio se trabajaron 6 "cepas" diferentes (de campo, vacunales y de referencia); además, el gradiente de ultracentrifugación se realizó con sacarosa, en diferentes concentraciones; posteriormente sólo se separaron 12 fracciones de 1 ml, las densidades que se obtuvieron fueron 1.112 a 1.184 y fueron detectadas partículas virales por Microscopía Electrónica de Transmisión, aunque las fracciones sean diferentes en cuanto a número, los resultados coinciden parcialmente ya que de esta manera podemos encontrar datos importantes en "cepa"s de referencia (1.184), "cepa"s de Campo (1.114), y "cepa"s vacunales (1.134). La diferencia en la DB puede variar por la velocidad y tiempo de la ultracentrifugación y esto puede cambiar la densidad isopícnica en las fracciones obtenidas. La DB puede variar también por el material que se va a utilizar para formar el gradiente y también por las células que se utilicen para propagar al VFPC, por lo que ha sido reportado desde 1.12 hasta 1.17 g/ml (Horzinek, 1981).

Existen diferentes formas de medir esta densidad, quizá por esto las partículas virales que se observaron, tales como: partículas incompletas, partículas completas, peplómeros, con una estructura relativamente icosaédrica por estar la envoltura íntimamente adherida y otros cambios visualizados por este método. Por lo que podemos concluir estas fracciones o picos detectados mediante el estudio de espectroscopía, coincidieron con los picos detectados, tanto de proteínas como de ácidos nucleicos y finalmente se confirmó que contenían partículas virales por la Microscopía Electrónica de Transmisión; los resultados del Capítulo 5 nos demostró si estas partículas pertenecen a la glicoproteínas o a proteínas importantes del VFPC. La diferencia observada así como las fracciones en que se encuentran los virus pueden variar dado que no se hizo centrifugación isopícnica sino separación por gradiente de velocidad. Quizá por esto las partículas virales que se observaron fueron tanto completas como incompletas y fracciones virales.

5. BIBLIOGRAFIA:

Horzinek, (1981). Non-Arthropod-Borne. Togaviruses. New York: Academic Press. In: Leman, A, (1986). Disease of Swine. Cap. 17 Hog Cholera. Iowa State University Press, pp. 290-291.

Mendoza, E.S., Correa, G.P., Hernández-Baumgarten, E. y Ciprián, C.A. (1992). Perspectiva de un Método de Diagnóstico Serológico rápido para Fiebre Porcina Clásica. I. XXI. Congreso Nacional Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos 1992, Acapulco, Gro., México, pp55.

Mengeling, W.L., Gutenkunst, D.E., Fernelius A.L. and Pirtle, E.C. (1973). Demonstration of an antigen relationship between Hog Cholera and BVD virus by immunofluorescence. Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science 27, 162-164.

Purchio, A.F., Larson, R. y Collett, M. (1984). Characterization of Bovine Viral Diarrhea virus proteins. Journal of Virology. Vol. 50 (2) pp. 666-669.

Terpstra, C; Bloemradd, M. and Gielkens, A.L. 1984. The neutralizing peroxidasa-linked assay for detection of monoclonal antibodies. in Epitopes on structural proteins of Hog Cholerae (Swine Fever) virus. Vet. Microbiol, pp. 41-50.

Terpstra, C and Wensvoort, G. (1988). Natural infections of pigs with Bovine Viral Diarrhoea Virus associated with signs resembling Swine Fever. Research in veterinary Science 45, 137-142.

Van Oirchot, J. (1983). Congenital infections with Togavirus. Veterinary Microbiology 8, 321-361.

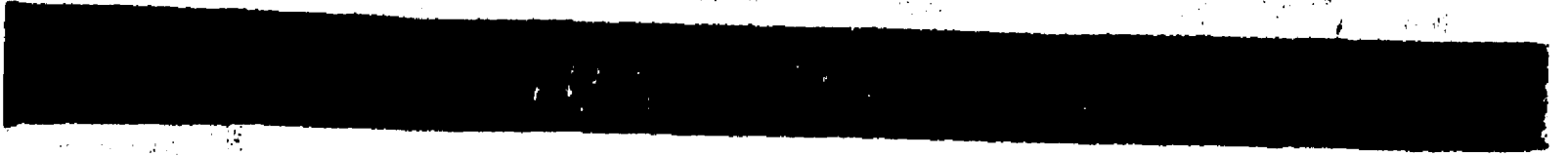
Wensvoort, G. Terpstra, C., Boonstra, J., Bloemraad, M. and Van Zaane, D. (1986). Production of monoclonal antibodies against Swine Fever virus and their use in laboratory diagnosis. *Veterinary Microbiology* 17, 129-140.

Wensvoort, G. (1989). Epitopes on structural proteins of Hog Cholera (Swine Fever) virus. Thesis doctor. Utrecht, March, 1989.

Wensvoort, G.C. Terpstra, E.P de Kluyver, C. Kragten, J.C. Warnaar. (1989). Characterization of pestivirus strains with monoclonal against Hog Cholera Virus. In *Epitopes on structural proteins of Hog Cholerae (Swine Fever) virus. Thesis. p. 41-50.*

Wensvoort, G. and Boonstra, J. Immuno-affinity purification of envelope protein E1 of Hog Cholera virus. Submitted to *Veterinary Microbiology*.

Westaway E.G., Brinton M.A., Gaidamovich D y A, Horzinek M.C., Igarashi A., Kääriäinen L, Lov D.K., Porterfield J.S., Russell P.K. Trent, D.W. (1985). *Flaviviridae. Intervirology* 24:125-139.



270 nm





270 nm



FALLA DE OXIGEN



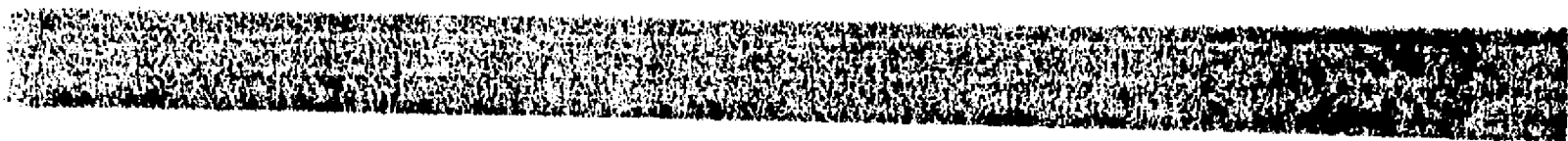
270 nm



24



270 nm



270 nm



CAPITULO 5

ESTUDIO ELECTROFORÉTICO Y DE INMUNOTRANSFERENCIA DE LAS FRACCIONES PURIFICADAS DE LAS "CEPAS" DE CAMPO, REFERENCIA Y VACUNALES DE FPC.

RESUMEN

Se estudiaron por electroforesis las proteínas y glicoproteínas del VFPC con la finalidad de encontrar diferencias entre las "cepas" de referencia, vacunales y de campo; además se investigaron por medio de la técnica de inmunotransferencia, con sueros de algunos lugares de la República Mexicana, con el objeto de detectar el reconocimiento de estas proteínas por sueros de cerdos de diferentes "status" inmunológico. Mediante las pruebas de electroforesis y las tinciones realizadas se observaron bandas bien definidas; con nitrato de plata se lograron visualizar bandas anteriormente y no reportadas en la bibliografía, entre las que se encuentran las glicoproteínas E1 y E2, además la proteína de cápside y la proteína de 31K. Se observaron proteínas de alto peso molecular en todas las "cepas". Los pesos moleculares se calcularon a partir de la regresión lineal, con los datos de los $Rf(s)$ de los pesos moleculares de las proteínas controles; y posteriormente se correlacionaron los $Rf(s)$ de cada muestra, para calcular su PM. Por otro lado se realizó la tinción también con Concanavalina A-peroxidada para detectar glicoproteínas. Con respecto a los resultados de inmunotransferencia, realizados con los sueros contra el VFPC, provenientes de las diferentes zonas del país; y con respecto al porcentaje de animales positivos, se observó que: Sonora tuvo 10 animales positivos un total de 21 (47.62%); Guanajuato 11 animales de 22 (50%); Yucatán 9 animales de 23 (39.13); de los animales desafiados, 11 animales de 18 (61.11), y finalmente de los controles 0 de 3 (0%), fueron positivos. Con respecto a los sueros de Sonora, no se encontró una respuesta asociada a las "cepas" patógenas de campo, exceptuando los sueros donde se encontró respuesta solamente en contra de las bandas de 23Kd y 51Kd, que correspondieron a proteínas comunes a todas las "cepas" vacunales. así como las de referencia; sin embargo, se encontraron reacciones aisladas en contra de fracciones de 210 y 219 Kd, las cuales no se encuentran reportadas con anterioridad. Con respecto a los sueros del Edo. de Guanajuato, se encontró una reacción importante contra: una de las "cepas" patógenas de campo, a las 2 vacunales y a la de referencia. Con respecto a los sueros de Yucatán las bandas fueron positivas moderadamente en contra de las "cepas" de campo. Estos resultados nos muestran que los sueros que reaccionaron a las "cepas" 3 y 4 de campo, no reaccionaron de igual manera a la de referencia y a las vacunales, esto puede descartar la posibilidad de que las "cepas" de campo sean "cepas" vacunales; mientras que la cepa a la que más reaccionaron los sueros fué a la cepa 5 (vacuna-PAV-250). Se encontraron varias bandas no reportadas con anterioridad. El perfil electroforético de las "cepas", se encontraron proteínas que al parecer son propias de las "cepas" de campo. Por lo que esta información puede ser de vital importancia para tomarlas como marcadores y poder diferenciar anticuerpos vacunales, de anticuerpos infectantes, lo cuál podría ser investigado en trabajos posteriores.

SUMMARY

In order to determine by immunoblotting what proteins are recognized by swine sera of different areas of México and varying degree of immunological state of the various "strains" of virus. Six "strains" of Classical Swine fever were used (CSF): Minnesota strain, PAV-1, PAV-250 strain and two field isolates 89-126 and 89-55. The most important fractions of each strain were determined by sucrose gradient centrifugation. Which were fractions 8 and 9 for all "strains" except ALD where the most important were fractions 3-4 and 9-10. Samples of the fractions from each strain were separated by PAGE at a 7.5 and 12% concentration with SDS. The concentrating gel used was 5% concentration. The fractions were transferred to nitrocelulose paper. The sera were collected in Sonora (a CSF free state), Guanajuato (under vaccination control campaign) and Yucatan (with a eradication campaign. The Sonora sera reacted only to bands 23 Kd and 51 Kd which were found in all of the "strains". The fractions more frequently recognized were 118,72,38,37,32,31,29, 228, 27, 25, 23 and 21 Kd and isolated reactions were observed against bands of 210 and 219 Kd, not previously reported. The Guanajuato sera reacted against a field isolate in a strong manner, also reactions against two vaccine "strains" and a reference strain. The main reactions were against bands 209*, 199*, 81*, 72*, 71*, 48, 49*, 44,37, 33-35, 28, 27, 24-26, 23,22, 21. The sera from Yucatan showed a moderate response against field isolates and the bands recognized were as follows: 210*, 175*, 80*, 68, 69, 51, 44-46, 37, 33-34, 26-29, 24, 23, 21. The challenged animals reacted to fractions 175*, 75,51, 42,29,28,27,24,22,21. On the other hands to which previously not reported activity was found are marked with an asterisk (*). The hyperimmune serum reacted to the field isolates 3 and 4, did not react in the same manner to the reference and vaccine "strains", which in turn can rule out the possibility that the field "strains" are escaped vaccine "strains". The strain where a more consistent reaction was observed was strain PAV-250, which is a vaccine strain. We think that these bands are characteristic of field "strains". Which in turn can be interpreted to mean that these bands can be used as markers to distinguish field "strains" from vaccine "strains".

1. 0. INTRODUCCION

El virus de la Fiebre Porcina Clásica (FPC) y el de la Diarrea Viral Bovina (DVB) pertenecen a la familia *Togaviridae* género *Pestivirus* (Horzinek 1973); antigénicamente (Darbishire 1960; Mengeling *et al.*, 1963) y estructuralmente (Enzmann y Weiland, 1978, Laude 1979) VFPC y DVB están estrechamente relacionados (Weenvort, 1990).

Tres proteínas del VFPC han sido descritas (Enzmann y Weiland, 1978): dos glicoproteínas de envoltura con pesos moleculares aparentes de 55K (GP55) y 46(GP46), y una proteína del "core", no glicosilada de 36K (P36). Estas proteínas similares han sido identificadas como proteínas estructurales en el virus de la DVB (Matthaeus, 1979). Las proteínas estructurales de los *Pestivirus* han sido identificadas como E1 (55K-57K), E2 (44K-46K) y C (34K-36K) (Westaway. *et al.*, 1985). En otro reporte se han encontrado trece epítopes, los cuáles fueron definidos por anticuerpos monoclonales para el VFPC. Los epítopes fueron agrupados en cuatro dominios antigénicos (A,B,C y D). Esto fue demostrado por medio de la prueba de captura de antígeno, los dominios están localizados en la misma proteína. Los AcMs dirigidos contra los dominios A,B y C se localizan contra los sitios de neutralización.

Los *pestivirus*, son virus RNA de 12-13 kb, que codifica aproximadamente para cuatro mil aminoácidos (Renard *et al.*, 1985; Colett *et al.*, 1988; Moorman y Hulst, 1988). Una organización tentativa de su genoma está basada en una copia del cDNA del RNA del virus DVB (Colett *et al.*, 1988) y el suero producido contra *E. coli* expresa productos de segmentos seleccionados del cDNA, que reaccionan con un total de 12 proteínas para el virus de la DVB. Estos investigadores localizaron que la secuencia del cDNA codifica para un péptido de 20k hacia el lado 5' del genoma. La secuencia codifica a una glicoproteína de 116k, esta proteína fue considerada como un precursor de 2 glicoproteínas, una de 62k y otra de 53k. La glicoproteína de 62k fue considerada también como precursor de otras dos glicoproteínas, una de 48k y otra de 25k. Una secuencia codifica para una proteína de 125 localizada como en tercer lugar, esa proteína fue considerada precursora de otras dos proteínas una de 54k y otra de 80k; una secuencia final es codificada para una proteína de 133k, esta proteína ha sido precursora de otras dos proteínas de 58k y de 75k. Cuáles de estas proteínas son estructurales? ¿Cuáles funcionales? y ¿Cuáles no estructurales?, aún se desconoce.

Enzmann,(1988), usó varios ensayos de inmunoprecipitación con proteínas de VFPC y VDVB. Las proteínas virales del lisado de células infectadas o de preparaciones con viriones purificados procedentes de fluidos de cultivos enriquecidos, de cultivos fueron detectados con antisueros específicos. Un amplio rango de resultados aparecieron de esta investigación; sin embargo, han sido poco concluyentes. Se ha encontrado una proteína de 34k-38k que se piensa sea de la cápside (C), dos glicoproteínas de 53 -57k (E1) y una de 44-48k (E2) estas proteínas son consideradas de envoltura. La proteína E1 del virus de la DBV fue capaz de inducir anticuerpos neutralizantes (Donis *et . al*, 1988, Magar *et al*,.1988), además se ha encontrado una diferencia entre las "cepas" de VBVD no citopatogénicas y las citopatogénicas. En cultivos celulares la "cepas" citopatogénicas generan una proteína no estructural de 87k, a partir de una original de 120k, pero no ocurrió con las "cepas" no citopatogénicas.

Wensvoort y colaboradores, en Holanda (1989) purificaron la cepa Brescia del VFPC a partir de lisados de cultivos celulares infectados, empleando un gradiente de glicerol al 30-0% / tartrato de Na-K al 0-55% y encontraron que la fracción proteínica aislada a una densidad boyante de 1.13 - 1.15 g/ml presentaba altos títulos infectantes, mientras que la fracción de 1.12 - 1.14 g/ml presentaba alta afinidad en el ECA. A las siete fracciones individuales presentes en estos dos "picos" se les realizó una electroforesis en un gel de poliacrilamida-SDS. En las primeras tres fracciones que pertenecieron a la fracción de alta infectividad sólo se encontraron la gp 54 y la gp 51; mientras que en las otras fracciones con alta afinidad al ECA y baja infectividad, revelaron sólo la gp 31 (Wensvoort *et al* 1990).

Wensvoort y cols., (1990), mostraron que el virión del VFPC es un partícula pequeña y esférica que consiste de una cápside hexagonal, conteniendo el genoma viral RNA de cadena positiva, el cual contiene en la envoltura 3 glicoproteínas virales denominados: E1(gp51 a gp54), E2 gp44 a gp48, y E3 (gp31). Estos investigadores encontraron una proteína de envoltura E1, la cual fue aislada por purificación con inmunofinidad con anticuerpos monoclonales dirigidos contra VFPC completo. La proteína E1 presentó una glicoproteína en forma de doblete, la cual varía en tamaño de 51K a 56K entre las tres proteínas probadas; esta proteína contiene un determinante antigenico el cual es conservado y esta involucrado en la neutralización por AcMs. En las células infectadas la E1 fue encontrada siempre unida a la glicoproteína 31K, cuando las uniones N-glicanes fueron removidas. La proteína E1 tiene un soporte principal que es un polipéptido de aproximadamente 47K. Después de la degradación de la E1 con la proteasa V8 de *Staphylococcus* se les realizó una electroforesis y una electrotransferencia, este polipéptido fragmentado contienen diferentes dominios antigénicos en la proteína E1 que fueron detectados con AcMs dirigidos contra VFPC. Tres proteínas estructurales estan involucradas: dos glicoproteínas de envoltura con valores de

PM: 55000 (55K) y 46000 (46K) y proteínas de cápside no-glicosiladas con un PM de 36000 (36K) las cuales fueron identificadas en el VFPC (Enzmann y Weiland, 1978). Otras proteínas similares han sido identificadas como proteínas estructurales en el virus de la DVB (Matthaeus 1979), las tres proteínas estructurales han sido tentativamente llamadas, E1 (55k a 57k), E2 (44k a 46k), C (34k a 36k) (Westawey y cols., 1985a). Sin embargo, las evidencias completas de estas proteínas confirman que son dos proteínas de envoltura y una proteína de la nucleocápside.

Los dominios A, B y C son sitios neutralizantes que probablemente reconozcan los componentes de la envoltura, después de la reducción el aparente PM de la gp24 y un doblete de gp47-gp45, indicando que el patrón migratorio en SDS-PAGE tiene cambios, posiblemente debidos a las diferentes formas de las proteínas. Las bandas de las proteínas de la muestra reducida, mostraron que la gp24 viene de gp31 y que la gp47-gp45 viene de la gp54-gp51, la gp31 y el doblete, ha sido detectada alguna bandas de peso molecular alto; gp90, sin embargo se parte dentro de bandas difusas a 70K a 76K y dentro del doblete gp54-gp51 y gp31. Así la gp70 comprime heterodímeros, hace a gp31 y un miembro de doblete gp54-gp51, gp90 probablemente comprime heterodímeros haciendo dos copias de gp31. Para determinar si eran proteínas estructurales el doblete gp54-gp31 y gp31, se aislaron estas proteínas de gradientes de purificación de la "cepa" Brescia del VFPC. Inicialmente el VFPC fue purificado a partir de los sobrenadantes de células infectadas; Se colectaron; se probó su infectividad, así como su densidad y fueron analizados por la prueba de ACA (ensayo de captura del antígeno). Los títulos altos y señales altas de ACA fueron detectadas en un pico, con dos densidades de 1.13 a 1.15 g/ml. y de 1.12 a 1.14 g/ml, respectivamente. El pico fue purificado por inmunoafinidad con AcMs 3 y entonces fueron probados por SDS-PAGE, y fueron detectadas únicamente las gp54 y gp51. Las siete fracciones individuales que constituían los dos picos fueron purificadas por inmunoafinidad y fueron probados con SDS-PAGE, bajo condiciones reductivas; las proteínas fueron entonces inmunotransferidas y teñidas con Concanavalina A (Con A) para detectar las glicoproteínas. En la primera de las tres fracciones, las cuales corresponden con los picos infectivos, gp54 y gp51 fueron predominantes, pero la gp31 fue poco visible.

Después de la electroforesis, el polipéptido fue fragmentado y los fragmentos fueron transferidos a papel de nitrocelulosa, utilizando la tinción con la Con A*P marcada con peroxidasa, los resultados revelaron que las gp54-gp51 habían sido digeridas en 5 fragmentos de 42K a 39K, 35K a 32K, 31K, 27K a 24K y 19K. Al probar las piezas del gel, se encontró que éste contiene bandas únicamente de gp51, revelando que la gp54 mostró 5 fragmentos de 42k, 35k, 31k, 27 y 19K, y hubo 5 también para gp51, 39k, 32k, 31k, 24k, 19k. Con los anticuerpos monoclonales se revelaron proteínas de 35k a 32k (Wenvoort, *et al.*, 1990).

Un fragmento de cDNA que cubre la región genómica, que codifica las proteínas estructurales del VFPC, fue insertado dentro de un gen del virus de la vaccinia. Los estudios de expresión con las recombinantes del virus de vaccinia/VFPC, permitieron la identificación de proteínas específicas del VFPC. La proteína del "core" del VFPC p23 fue demostrada por primera vez usando un antisuero contra una proteína de fusión bacteriana. Las glicoproteínas expresadas por la recombinante vaccinia-VFPC, fueron heterodímeros unidos por disulfuros, entre gp55 y gp33 que fueron detectados previamente en células infectadas con el VFPC (Rumenapf *et al.*, 1991).

Otra proteína de la nucleocápside de 14 Kd también fue detectada (VFPC p14). Así mismo, una proteínas equivalente se encontró en viriones de otros pestivirus (VDVB). La envoltura del VFPC está compuesta de tres glicoproteínas: gp44/48, gp33 y gp55. Las tres existen en la forma de dímeros con uniones disulfuro en las células infectadas por el VFPC; las gp 44/48 y gp55 están en forma de homodímero, mientras que la gp55 es también encontrada en forma dimérica con la gp33. Cada complejo con interacciones covalentes entre las glicoproteínas estructurales no ha sido descrito, en el caso del RNA VDVB p12/80 actualmente representa proteínas no estructurales, las proteínas con un aparente peso molecular de 25, 26, 36 y 34 kd son probablemente idénticas a la gp33 del VFPC y a la gp25 del VDVB, pero no han sido descritas como moléculas glicosiladas. Sin embargo, dos de las tres glicoproteínas estructurales putativas han sido detectadas en viriones. La gp53 de VBVD y la gp55 del VFPC han sido indirectamente mostradas como parte del virión, con pruebas de neutralización utilizando anticuerpos monoclonales (Thiel *et al.*, 1991).

En un estudio realizado por Greiser-Wilke y cols.,(1992), se analizó la expresión de las proteínas no estructurales (ne) p80 y p125, en células infectadas con diferentes pestivirus. La técnica utilizada fue la de radioinmunoprecipitación con anticuerpos monoclonales y contra pestivirus específicos .

A VFPC se le han encontrado tres proteínas estructurales en la envoltura viral, dos de ellas son glicoproteínas (gp) y se denominan: **E1 ó gp 55** (55,000 daltones). La proteína estructural E1 es heteróloga para los Pestivirus y dependiendo de las publicaciones puede tener un PM de 51 a 58d; **E2 ó gp 46** (46,000 daltones), otros autores encuentran que tiene un PM (44-46 K); la tercera, que no está glicosilada, fue denominada **C ó p 36** (36.000 daltones), otros autores han encontrado que está en un rango de (34-36 K). También el VFPC presenta proteínas de cápside de (34-38 K). Por último, la proteína (31 K), es importante para la infección, sin embargo no es clara aún su participación como proteína estructural en el VFPC (Wensvoort, *et al.*, 1990; Van Rijn, 1993).

2.0. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1. Seleccionar las fracciones importantes, previamente separadas, por el gradiente de sacarosa, de las seis "cepas" en estudio del VFPC.**
- 2. Realizar estudios comparativos y encontrar diferencias entre las seis "cepas" de (campo, vacunales y de referencia), del VFPC, mediante estudios de electroforesis en geles de poliacrilamida.**
- 3. Obtención de sueros de cerdos de diferente "status" inmunológico, provenientes de diferentes lugares de la República.**
- 4. Realizar estudios comparativos y encontrar diferencias entre seis "cepas" de (campo, vacunales y de referencia), del VFPC, mediante estudios de inmunotransferencia.**

3.0. MATERIAL Y METODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO:

Se utilizaron 6 "cepas" en total, tres "cepas" vacunales: Minnesota, PAV-1 y PAV-250; una de referencia: ALD y dos de campo: 89-126 y 89-55.

3.2. SELECCION DE FRACCIONES

De cada "cepa" fueron seleccionadas las fracciones más importantes como se observa en el Cuadro 1. Las identificaciones para las seis "cepas" fueron las siguientes:

Av= Cepa Minnesota (vacunal)	De= Cepa 89-126 (campo)
Bv= Cepa PAV-1 (vacunal)	Ec= Cepa 89-55 (campo)
Cv= Cepa PAV-250 (vacunal)	Fr= Cepa ALD (referencia)

3.3. ELECTROFORESIS DE LAS FRACCIONES EN GELES DE POLIACRILAMIDA CON DUODECIL-SULFATO DE SODIO (SDS)

- Las fracciones obtenidas de cada cepa, se trataron con un detergente no iónico (NP 40).
- Para la preparación del gel de poliacrilamida al 7.5% y 12% con SDS y del gel concentrador al 5% según Laemmli (1970), así como de los reguladores de corrimiento y de la muestra con 2-mercaptoetanol, se prepararon las siguientes soluciones:

1.. Solución de monómeros, acrilamida-bis acrilamida (30.8% y 2.5%).

Acrilamida.....	30.0 g
Bis-acrilamida.....	0.8 g
H ₂ O desionizada c.c.p.....	100.0 ml

Se filtra en papel Whatman 1 y se guarda a oscuridad a 4 C.

2. Regulador del gel de separación Tris-HCl 1.5 M pH8.8.

Trizma base.....	9.08 g
H ₂ O desionizada	45.0 ml
Se ajusta el pH (8.8) con HCl 6N,	
Aforar a	50.0 ml

Se filtra en papel Whatman y se guarda a 4 C.

CUADRO 1.- CARACTERÍSTICAS DE LAS SEIS "CEPAS" SELECCIONADAS DEL VFPC DE LOS ESTUDIOS ANTERIORES Y RESULTADOS DE LA MICROSCOPIA ELECTRONICA

"CEPA"	IF	IP	AcMs Y P	AcMs FPC	FRACC	PROT	DB δ gr/ml 1.12-1.15	r	ESPECTRO ABS (λ)	M.E.
MINNESOTA	10 ⁺⁺	10 ⁺⁺	BVD (-) BD (-)	5,6,8,13d	8 Y 9	246.72	1.146	83	1 PICO 245.86 3 PICO 284	(+)
PAV 1	10 ⁺⁺	10 ⁺⁺	BVD (-) BD (-)	5,6,8W,13 d	8 Y 9	331.00	1.134	94.5	1 PICO 242.54 1 PICO 279.71	(+)
89-126	10 ⁺⁺	10 ⁺⁺	BVD (-) BD (-)	6,8	8 Y 9	399.07	1.116	99.2	1 PICO 236 1 PICO 280.57	(+)
89-55	10 ⁺⁺	10 ⁺⁺	BVD (-) BD (-)	6,8	8 Y 9 10 Y 11	369.03 186.74	1.112	98.6	F8 1 PICO 243.07 1 PICO 280.57 F10 2 PICO 239.42 1 MESETA 264.28 285.71	(+)
PAV-250	10 ⁺⁺	10 ⁺⁺	BVD (-) BD (-)	6	8 Y 9	413.11	1.124	98.5	1 PICO 246.28 1 PICO 282.28	(+)
AID	10 ⁺⁺	10 ⁺⁺	BVD (-) BD (-)	5,6,8	3 Y 4 9 Y 10	213.72 222.31	1.184	94.4	F9 1 MESETA 255.28-298.57 F3 1 PICO 248 1 PICO 279.14	(+)

IF= Inmunofluorescencia IP=Inmunoperoxidasa AcMs=Anticuerpo Monoclonal P=Polclonal; d=Reacción débil, FRACC=Fracción; Prot=Proteínas, DB=Densidad Boyant; r=Regresión Lineal F=Fracción λ= Longitud de onda; M.E.=Microscopia Electrónica; (+) = Partículas virales

3. Regulador del gel concentrador Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8.

Trizma base..... 3.03 g
 H₂O desionizada 45.0 ml
 Se ajusta en pH con HCl 6N,
 Aforar a 50.0 ml
 Se filtra en papel Whatman y se guarda a 4 C.

4.- Lauril Sulfato de Sodio (Dodecil sulfato de sodio, SDS) al 10%.

SDS..... 1.0 g
 H₂O desionizada 10.0 ml

5.- Persulfato de amonio al 10%.

Persulfato de amonio..... 0.1 g
 H₂O desionizada 1.0 ml
 Se prepara al momento de usarse.

6.-TEMED(N',N',N',N' Tetrametilendiamina).

Se usa del frasco.

7.- Solución amortiguadora de corrida (Tris 0.025 M, glicina 0.192 M- SDS al 0.1%, pH 8.3).

Trizma base..... 12.108 g
 Glicina..... 57.600 g
 SDS al 10%..... 4.g
 Aforar con H₂O desionizada ... 4000.00 ml
 No debe de ajustarse el pH. El regulador no debe ser reutilizado, debe desecharse.

8.- Solución Digestora

Tris 0.5 M, pH 6.8..... 4.375 ml
 SDS 0.1 g
 Glicerol..... 0.5 ml
 2-Mercaotoetanol.... 0.25 ml
 Azul de bromofenol 0.002 %

9.- Preparación del Gel

a) Gel para Tapón.

Sol. Acril-Bis (Amor pH8.8).....	1.0 ml
TEMED.....	7.0 ul
Persulfato de amonio.....	13.0 ul

b) Gel separación de 7.5%

En un matraz kitazato colocar:

Amortiguador pH 8.8.....	7.5 ml
Sol. Acril-Bis (Amort pH8.8).....	2.5 ml
NOTA: Se hace vacío durante 10 minutos.	
TEMED.....	25.0 ul
Persulfato de amonio.....	50.0 ul

b) Gel separación de 12.5%

En un matraz kitazato colocar:

Amortiguador pH 8.8.....	5.9 ml
Sol. Acril-Bis (Amort pH8.8)....	4.2 ml
NOTA: Se hace vacío durante 10 minutos.	
TEMED.....	50.0 ul
Persulfato de amonio.....	100.0 ul

c) Gel concentrador para el peine

En un matraz de kitazato colocar:

Amortiguador pH 6.8.....	5.2 ml
Sol. Acril-Bis (Amort pH6.8).....	0.8 ml
NOTA: Se hace vacío durante 10 minutos.	
TEMED.....	20.0 ul
Persulfato de amonio.....	40.0 ul

3.3.1. PREPARACIÓN DE LOS GELES

La mezcla se vierte rápidamente a la cámara de electroforesis Modelo No. SE 250 (Hofer Scientific Instruments), se coloca rápidamente aproximadamente 1 ml de isopropanol sobre la superficie, cuando la gelificación se llevó a cabo se observó una interfase muy definida entre el isopropanol y el gel, entonces se enjuaga y se escurre. Posteriormente se pone la mezcla para el gel concentrador adicionado con cuidado y rapidez, luego se colocó el peine, el cual se retira cuando el gel se ha polimerizado, quedando de esta forma los pozos bien definidos.

3.3.2. PREPARACIÓN Y CORRIMIENTO DE LAS MUESTRAS.

- Se colocó el volumen suficiente la muestra que contenga un mínimo de 20 µg de proteína en tubos eppendorff bien etiquetados.
- Se agregó el mismo volumen de solución digestora, se mezcló y se hirvió en baño de María durante 3 minutos.
- Se hizo una precorrida de 30 minutos a 25 mAmp
- Posteriormente con la ayuda de una jeringa Hamilton o con puntas multiflex de 20 µl (Sorenson), se colocó la mitad del volumen preparado de cada muestra en los carriles del gel de concentración.
- Junto con las muestra problemas, se colocó en un carril, una muestra de proteínas de PM conocido (SDS Molecular Weight Markers (MW-SDS-200), Anhidrasa Carbónica de 29 Kd; Ovoalbúmina de 45 Kd; Albúmina Bovina de 66 Kd; B-Galactosidasa de 116 Kd y Miosina de 205 Kd.), con el fin de tomarlas como referencia.
- Se corrió en una fuente de poder Mod. PS250/25 Amp (Hofer Scientific Instruments).
- Se hizo una corrida durante de 30 a 45 minutos a 25 mAmp, hasta el momento en que el colorante que sirva de referencia y llegue al final del gel de separación.

3.3.4 Tinción de geles de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio PAGE con Azul de Coomassie R-250

- Solución stock del colorante

Azul de Coomassie.....	2.0 g
H ₂ O desionizada	200.0 ml

1. Colorante de trabajo para tinción de proteínas Coomassie al 0.125% en metanol:acético:agua.

Solución stock.....	62.5 ml
metanol absoluto.....	250.0 ml
Acido acético glacial.....	50.0 ml
H ₂ O desionizada	137.0 ml
Se filtra en papel Whatman No.1.	

2. SOLUCION DESTENIDORA I.

Metanol.....	250.0 ml
Ac. acético.....	50.0 ml
H ₂ O desionizada	200.0 ml

3. SOLUCION DESTENIDORA II.

Metanol.....	25.0 ml
Ac. acético.....	35.0 ml
H ₂ O desionizada	440.0 ml

3.3.4. TINCION DE GELES

Se puso el gel en un recipiente con la solución teñidora durante 2-3 horas, con agitación lenta, a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se sacó el gel con cuidado y se colocó en la solución desteñidora I durante 2 horas. Posteriormente se transfirió a la solución desteñidora II hasta que las bandas se observaron.

3.3.5. TINCIÓN DE GELES CON NITRATO DE PLATA (Hitchcock y Brown, 1983; Tsai y Frash, 1982).

- 1.- Después de la electroforesis, se retiró el gel de poliacrilamida y se dejó fijando toda la noche con 200 ml por gel (isopropanol 25%/Ac. Acético 7%).
- 2.- Después de 24 hrs. de fijación se realizó la oxidación con (150 ml de agua desionizada + Ac. peryódico 1.05 g + 10 ml Et-OH 40% + Ac. acético 7% + 4 ml de isopropanol al 25% v/v), durante 5 minutos con agitación lenta.
- 3.- Se lavó 8 veces con agua desionizada (cada vez con 200 ml durante media hora cada una).

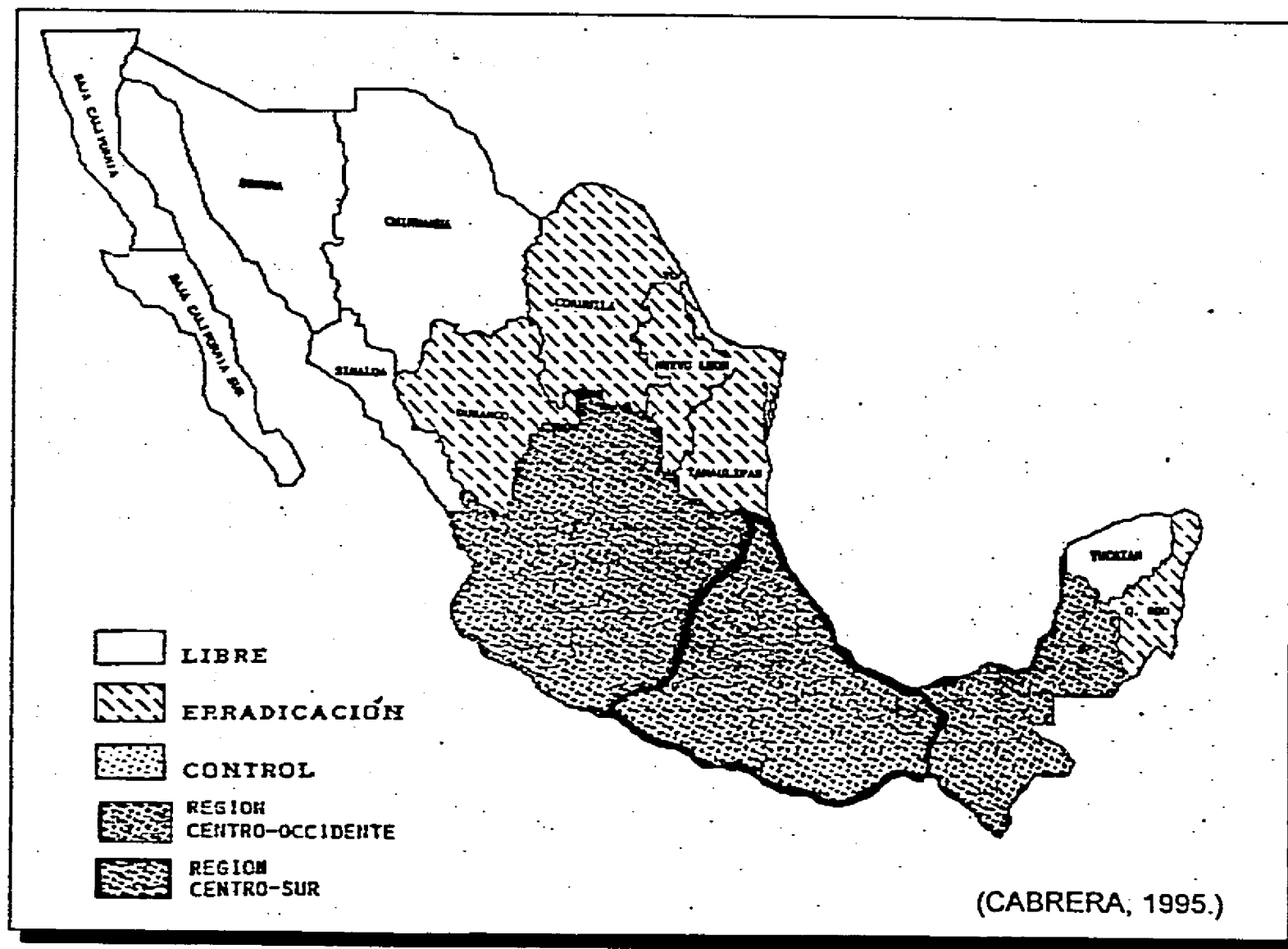
- 4.- Se tiñó con (28 ml de NaOH 0.1 N + 0.9 de agua desionizada + 2.1 de NH₄OH al 70% en solución fría).+ 5 ml gota a gota de AgNO₃ al 20%. + 115 ml de H₂O desionizada fría. Esperar 10 minutos a temperatura ambiente con agitación vigorosa.
- 5.- Lavar 4 veces con agua desionizada por 10 minutos cada vez.
- 6.- Revelar de 10 a 20 minutos con 250 ml de revelador, preparado con 50 mg de Ac. cítrico más 0.5 ml de formaldehído y se aforo a un litro.
- 7.- Posteriormente se observaron las bandas, se para la reacción durante 1 h sin agitación con la solución (200 ml de agua deionizada + 10 ml de ac. acético 7% v/v).
- 8.- Lavar con 200 ml de agua desionizada.
- 9.- Conservar correctamente el gel.
- 10.- Medir los R_f (Movilidad relativa), para correlacionar los PMs, en base a **la Ecuación de Regresión**, que se obtenga de los resultados

$$\text{Movilidad relativa} = \frac{\text{distancia de la migración X tamaño del gel antes de secar de cada proteína.}}{\text{tamaño del gel después de secarlo} \times \text{distancia de migración del frente del colorante}}$$

3.4. OBTENCIÓN DE SUEROS DE DIFERENTES ANIMALES DE ALGUNOS ESTADOS DE LA REPUBLICA MEXICANA.

Se muestrearon animales de diferentes partes de la República Mexicana: **Sonora, Guanajuato, Estado de México y Yucatán**. Finalmente se solicitaron al Dr. Pablo Correa, sueros de **animales experimentales** y se obtuvo un suero de un cerdo SPF. Se muestrearon animales de diferentes zonas del país, Sonora que actualmente se encuentra libre de FPC; Irapuato que se encuentra en zona de control con vacunación extensiva y control de movilización; y Yucatán zona en erradicación; esto se observa en la Figura 5. Los animales controles son sueros de animales libres de patógenos específicos (SPF).

FIGURA 5. ZONAS DEL PAIS, QUE ESTAN EN LA CAMPAÑA NACIONAL CONTRA LA FPC. NOM EM012-200-1994. PUBLICADO EN EL DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN EL 25 DE ENERO DE 1995.



3.5.ELECTROTRANSFERENCIA (Towbin, H. *et al.*,1979; Wenvoort,G. 1989).

- 1.- Posteriormente de que se realizó la PAGE (Electroforesis en geles de poliacrilamida)
2. Se cortaron pedazos de papel de nitroceluosa (Immobilon-P Millipore Corporation, Bedford, MA.), de poro de 0.45 μm del tamaño del gel. De preferencia se debe usar guantes para evitar dejar huellas. Antes de usarse deben sumergirse algunos segundos en metanol para activarlos.
- 3.- También se cortan 4 pedazos de igual tamaño de papel filtro por cada tira de Imunobilon-P.
- 4.- En un recipiente se ponen a humedecer con el amortiguador de transferencia (Tris 25 mM (pH 8.3), Glicina 0.192 M SDS 0.1%, Metanol 20%, SIGMA), las fibras (Scotch Brite).
- 5.- Se tomó un "cassett" del aparato de electrotransferencia (TE 22 Mighty Small Transphor. Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA).
- 6.- Se colocó de la forma que se explica a continuación, posteriormente todo se cubre con el amortiguador de transferencia (sistema: metanol-tris-glicina).

Acrílico
Fibra
papel filtro
Inmobilón-P
Gel de Poliacrilamida
papel filtro
fibra
Acrílico

NOTA: Cuidando de que no se formen burbujas entre el papel filtro y gel. Se le pone una marca con lápiz en la orilla del papel filtro. Se cierra, quedando todo firmemente aprisionado.

- 7.- Se colocó el "cassette" en la cámara de transferencia y se conectó a los electrodos de tal manera que el cátodo este del lado del gel.
- 8.- Se conectó al sistema de la fuente de poder (EC-135 E-C-Apparatus Corporation. St. Petesburg, Florida). La transferencia se realiza a 30 V, voltaje etc. durante 1.6 horas con agitación constante (PCM-Agitador magnetico) y reflujo de agua fría.

9.- Al término de la transferencia se procesó para detectar las proteínas transferidas. Se corta el pedazo donde se corrieron los marcadores y se tiñó con negro amido:

3.6. TINCIÓN CON NEGRO AMIDO

Negro amido 0.1%
 Met-OH 45.0 ml
 Ac. acético 10.0 ml
 Agua dest. 45.0 ml

1.- Se sumergió el pedazo del papel de nitrocelulosa en esta solución, durante 5 minutos; posteriormente se lava con agua destilada durante 1 min y se lavan con las dos soluciones desteñidoras que se utilizan en el proceso de PAGE; finalmente se observan las bandas presentes.

2.- Si no se procede a realizar la inmunotransferencia, después de la transferencia las membranas de nitrocelulosa pueden guardarse en PBS a 4 C, o enjuagarse con agua desionizada y son almacenadas secas a -20C.

3.7. INMUNOTRANSFERENCIA

3.7.1. SOLUCIONES

1. SOLUCIÓN AMORTIGUADA DE TRIETANOLAMINA (TBS) pH 7.2

NaCl..... 7.5 g
 Trietanolamina..... 2.8 ml
 HCl 1N..... 17.0 ml
 MgCl.6H₂O..... 0.1 g
 CaCl.2H₂O..... 0.02g
 H₂O destilada.....980.2 ml

2. SOLUCIÓN DE LECHE DESCREMADA AL 5% EN TBS

Skim- Milk..... 5.0 g
 TBS..... 100.0 ml

3. SOLUCIÓN REVELADORA (Substrato)

Alfa-Cloronaftol..... 30.0 mg
 Metanol..... 10.0 ml
 TBS..... 50.0 ml
 H₂O₂..... 50.0 µl

4. SOLUCIONES DEL KIT ELISAMATE (KPL)**SOLUCIÓN DE LAVADO**

Concentrada 20X/200 ml

SOLUCIÓN BLOQUEADORA/BSA

Concentrada 100 ml

SOLUCIÓN PARA PARAR LA REACCIÓN.

CONCENTRADA (5X) 5% SDS

SOLUCIÓN "COATING"

Concentrada 10X/25 ml.

3.7.3. PROCEDIMIENTO**1. Aplicación Antígeno**

- a. Adicionar 400 µl de solución "coating" a cada carril.
- b. Se incubó durante 1 hr. a temperatura ambiente, con agitación suave.
- c. Posteriormente vaciar las placas y sacudirlas sobre una toalla, tratando de que queden lo más seco posible.
- d. Se adicionó 400 µl de solución bloqueadora/BSA (preparada en el momento).
- e. Se esperó la reacción durante 5 minutos, se vació y sacudió sobre una toalla.

2. Reacción del Primer Anticuerpo

- a. Se le adicionó 400 µl del suero problema (1:25), detectado por medio del tablero de ajedrez.
- b. Permitir la reacción durante 1 hora, a temperatura ambiente con agitación suave.
- c. Posteriormente vaciar las placas y sacudirlas sobre una toalla, tratando de que queden lo mas secos posible.
- d. Se llevó a cabo el proceso de lavado
 - d.1. Se llenaron los carriles o tubos con 400 µl de la solución para el lavado.
 - d.2. Se vació y se sacudió.
 - d.3. Se repitió esta operación 5 veces.
 - d.4. Se volvió a sacudir sobre una toalla.

3. Solución del anticuerpo secundario, marcado.

- a. Se adicionó 400 μ l de la solución preparada del anticuerpo secundario marcado (anti-IgG*-SIGMA-Chemical), a una dilución 1:200 con solución de Skim Milk al 1%.
- b. Se dejó reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación suave.
- c. Posteriormente vaciar las placas y sacudirlas sobre una toalla, tratando de que queden lo más secas posible.
- d. Llevar a cabo el proceso de lavado, mencionado anteriormente.
- e. El último lavado dejarlo durante 5 minutos y posteriormente desechar el líquido y secar las placas.

4. Reacción del Substrato

- a. Se depositó 400 μ l de de la solución de substrato en cada carril o tubo.
- b. Permitir la reacción durante 20 mins a 1 hr, hasta que se observe el desarrollo del color.
- c. "Opcional": Si se desea parar la reacción usar 100 μ l de la solución "STOP" en cada carril o tubo.
- d. Lectura de las bandas que se observen.

3.7.4. TECNICA PARA DETECTAR GLICOPROTEÍNAS (Hawkes, 1982, modificada por Weenvoort, 1989).

- a. Para detectar las glicoproteínas en las tiras de Inmobilón-p que fueron transferidas, se tiñó con Con-A marcada con peroxidasa (Sigma).
- b. Las tiras se lavaron por 10 minutos en TBS (Tris-HCl 50mM (pH=7.4), con NaCl 200 mM, más SFB (Suero Fetal Bovino al 10%).
- c. Se incubó durante 30 minutos en TBS conteniendo Con-A (10 μ g/ml).
- d. Las tiras se lavaron tres veces en TBS
- e. Después del lavado se sumergieron en una solución fresca de 4-Cloro-1-Naphtol (Sigma) en 10 ml de metanol, 40 ml de TBS, y 15 μ l de H₂O₂ 30%
- f. Se lavaron y se observaron las bandas presentes.

3.7.5.. Tablero de Ajedrez

El suero problema y anti-anticuerpo IgG peroxidado tuvieron que ser probados y estandarizados para localizar su concentración óptima para trabajar la Técnica de Inmunotransferencia.

4. 0. RESULTADOS

Se trabajó con dos concentraciones de geles al 7.5 y al 12.5% (acrilamida-bisacrilamida), encontrando mejores resultados con geles al 7.5% ya que permitieron observar mejor las bandas, más separadas y mejor definidas.

La Figura 1, muestra un gel preparado al 7.5% y teñido con azul de Coomassie, donde se observa las bandas de los pesos moleculares estandares y las bandas de las "cepas" en estudio. La Figura 2, nos muestra un gel al 12.5%, con la tinción con Nitrato de Plata, el cual nos muestra que existen glicoproteínas (color verdoso y rojizo) en las "cepas", pero las bandas no se encuentran bien separadas.

Las Figuras 3 y 4 nos muestran geles al 7.5% con las seis "cepas", con sus fracciones correspondientes, estos geles fueron teñidos con Nitrato de Plata y las bandas se ven bien definidas. Para llegar a tener estos patrones electroforéticos se trabajaron 25 geles.

La Gráfica 1 muestra la curva de calibración de los marcadores de pesos moleculares estandares resultando una ecuación de regresión: **Log PM=2.4367-1.144Rf** con una correlación (r) de 0.9395+/-0.1026; posteriormente se dieron los valores de los Rfs obtenidos de cada banda y se obtuvieron todos los pesos moleculares. Acorde con $1\pm 2\sigma$, el rango de fluctuación de gel a gel para una proteína es de $2\pm$ (antilog 0.1026)= **+/-2.6 Kd.**

Los pesos moleculares de las seis "cepas" del VFPC obtenidas a partir de las pruebas de electroforesis, podemos observarlos en el Cuadro 2. En este cuadro se muestra que cada cepa tiene proteínas específicas; podemos observar las proteínas que se detectaron por el método de SDS-PAGE, por medio de dos tinciones de Nitrato de Plata y Azul de Coomassie y otro con la tinción de ConA*peroxidada; al mismo tiempo se pueden comparar las proteínas que están descritas en la bibliografía contra las que se detectaron en este trabajo.

"Cepa" Av (Minnesota), para esta cepa las proteínas únicas no compartidas son: 233.2; 177.4, 45, 2 y 40.2, además de tener 5 glicoproteínas (146.3; 47.9; 31; 25 y 21) que fueron observadas con la tinción de la Concanavalina A*Peroxidada.

"Cepa" Bv (PAV-1), las proteínas únicas son (239.6; 126.6 y 63.4), y sus glicoproteínas con Con A*P (58.3; 22.4; 21).

"Cepa" Cv (PAV-250), las proteínas únicas son (248.7; 212.7; 187.3; 141.1; 110.9), y sus glicoproteínas son (183.2; 28; 21).

"Cepa" Dc (89-126), las proteínas únicas son (257.7; 231.1; 207.5; 105.7), y sus glicoproteínas son (209.1; 117; 82; 65.5; 55.1; 35; 33.5; 31; 26; 24.2; 21.4).

"Cepa" Ec (89-55), las proteínas únicas (205.6; 184.; 172.1; 111; 77; 57.9, 37.6; 31; 30, 28.5), y sus glicoproteínas son (74.9; 47.9; 38.3; 21.4).

"Cepa" Fr (ALD), las proteínas únicas son (235.2; 227; 194; 165.7, 160.3; 100.5) y sus glicoproteínas son (57.3; 31; 28; 23.4).

FIGURA 1. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA CON "CEPAS" DE VFPC., TEÑIDO CON AZUL DE COOMASSIE

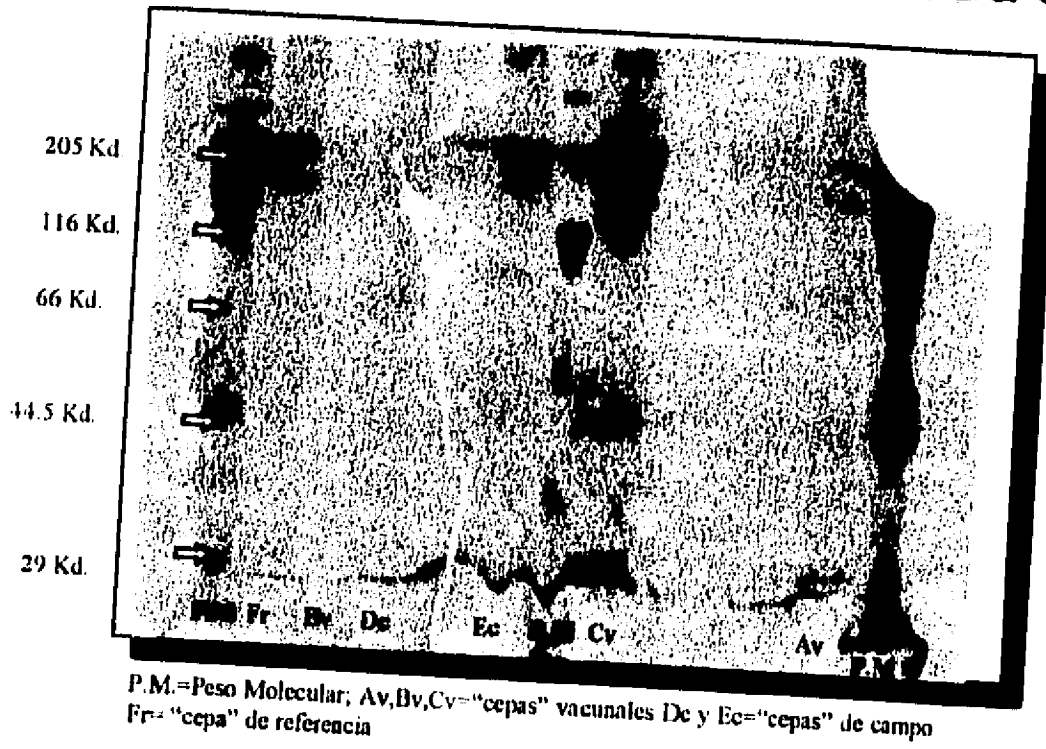


FIGURA 2. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA CON "CEPAS" DE VFPC., TRATADAS CON AC. CAPRILICO Y TEÑIDAS CON NITRATO DE PLATA

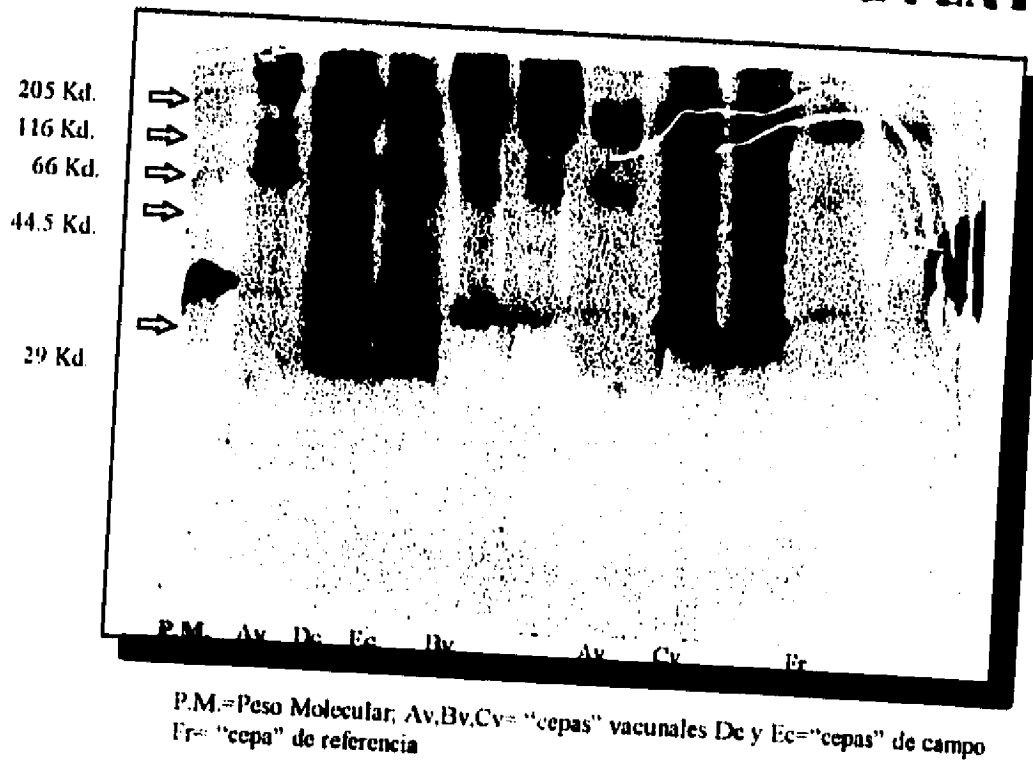
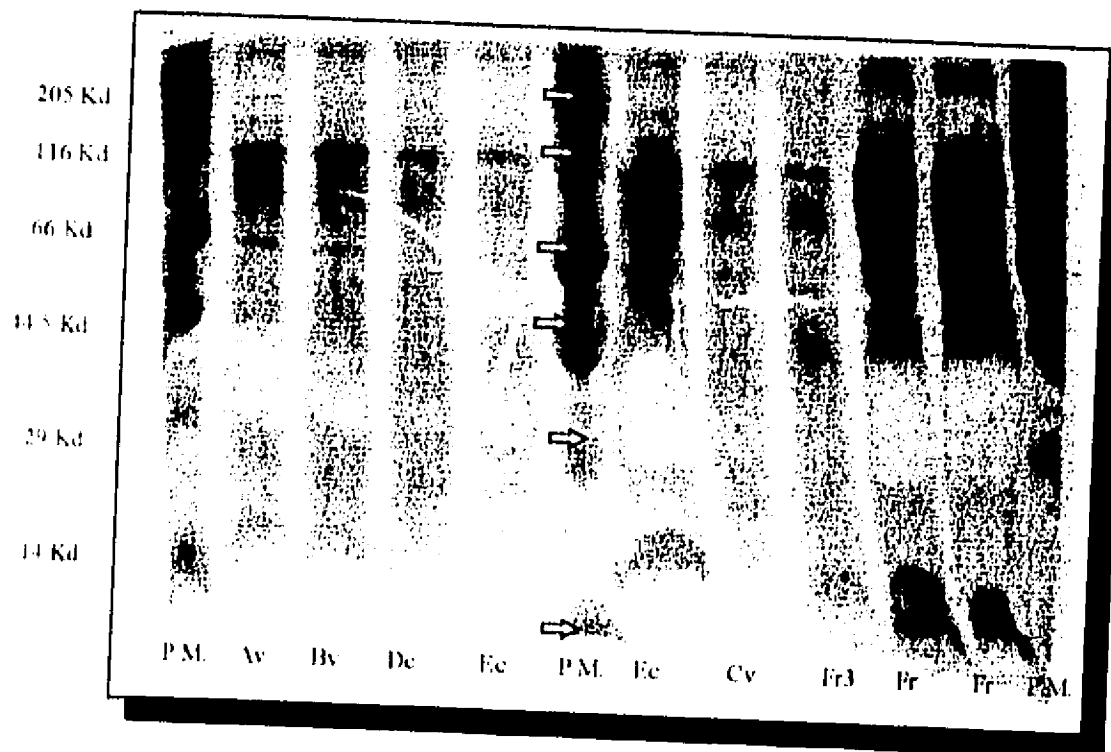


FIGURA 3. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA CON "CEPAS" DEL VFPC., TEÑIDO CON NITRATO DE PLATA



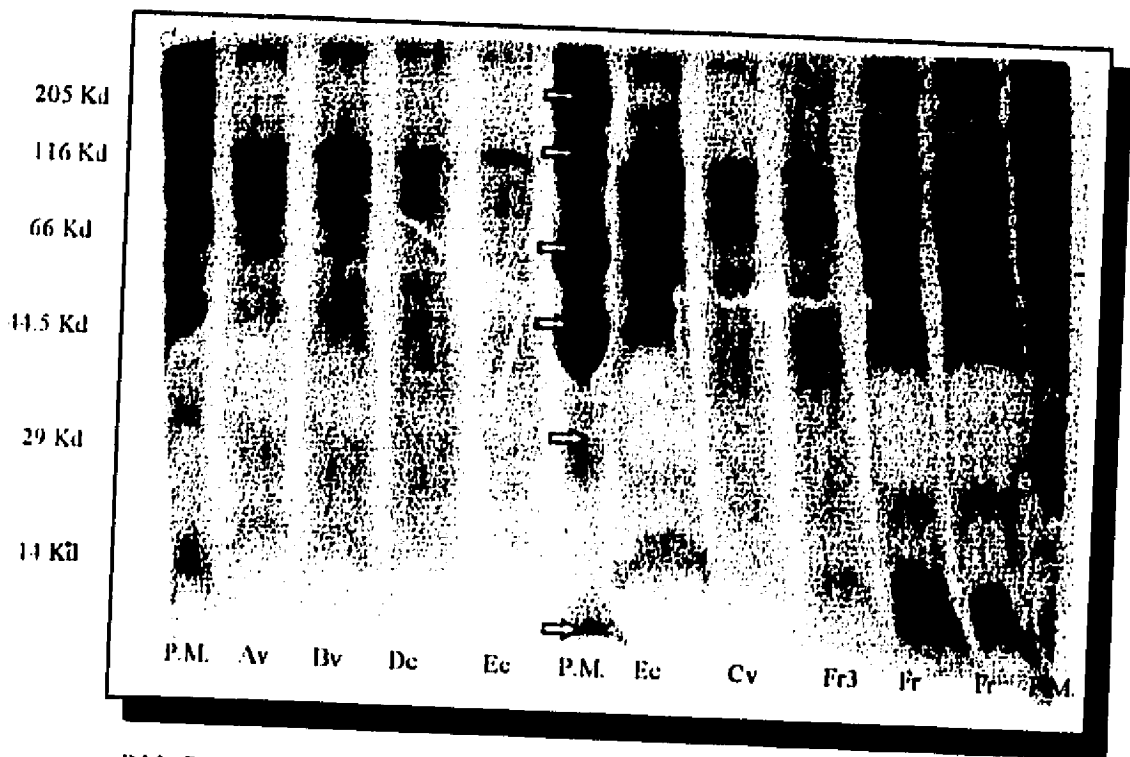
PM - Peso Molecular, Av, Bv, Cv "cepas" vacunales, Dc y Ec "cepas" de campo, Fr "cepa" de referencia

FIGURA 4. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA CON "CEPAS" DE VFPC., TEÑIDO CON NITRATO DE PLATA



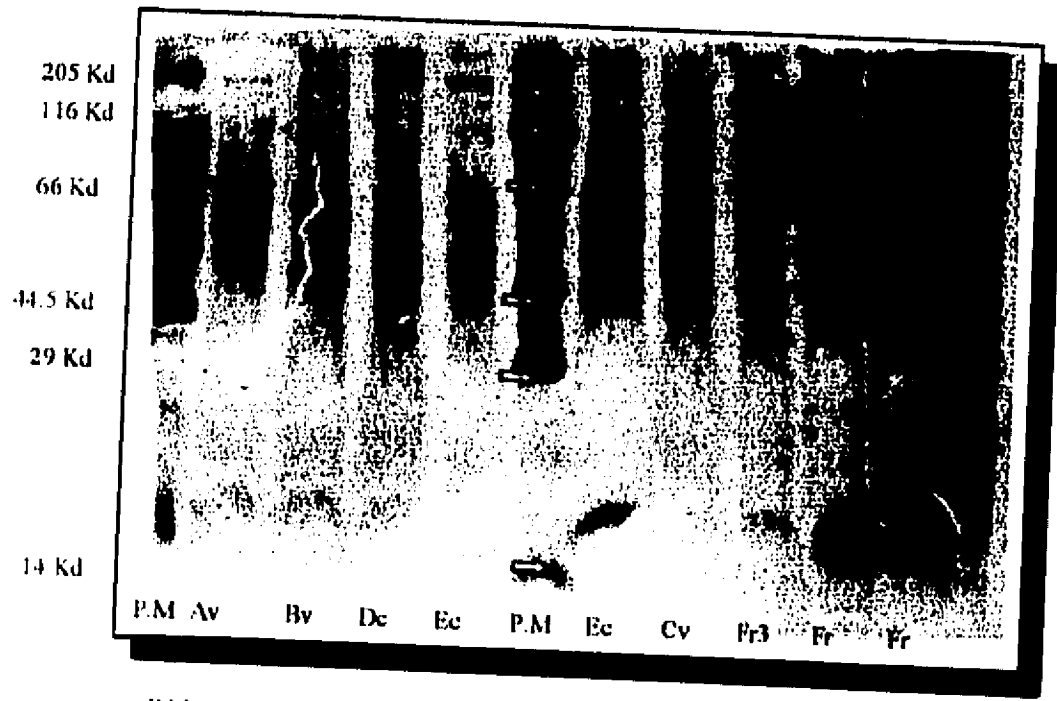
PM - Peso Molecular, Av, Bv, Cv "cepas" vacunales, Dc y Ec "cepas" de campo, Fr "cepa" de referencia

FIGURA 3. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA CON "CEPAS" DEL VFPC., TEÑIDO CON NITRATO DE PLATA



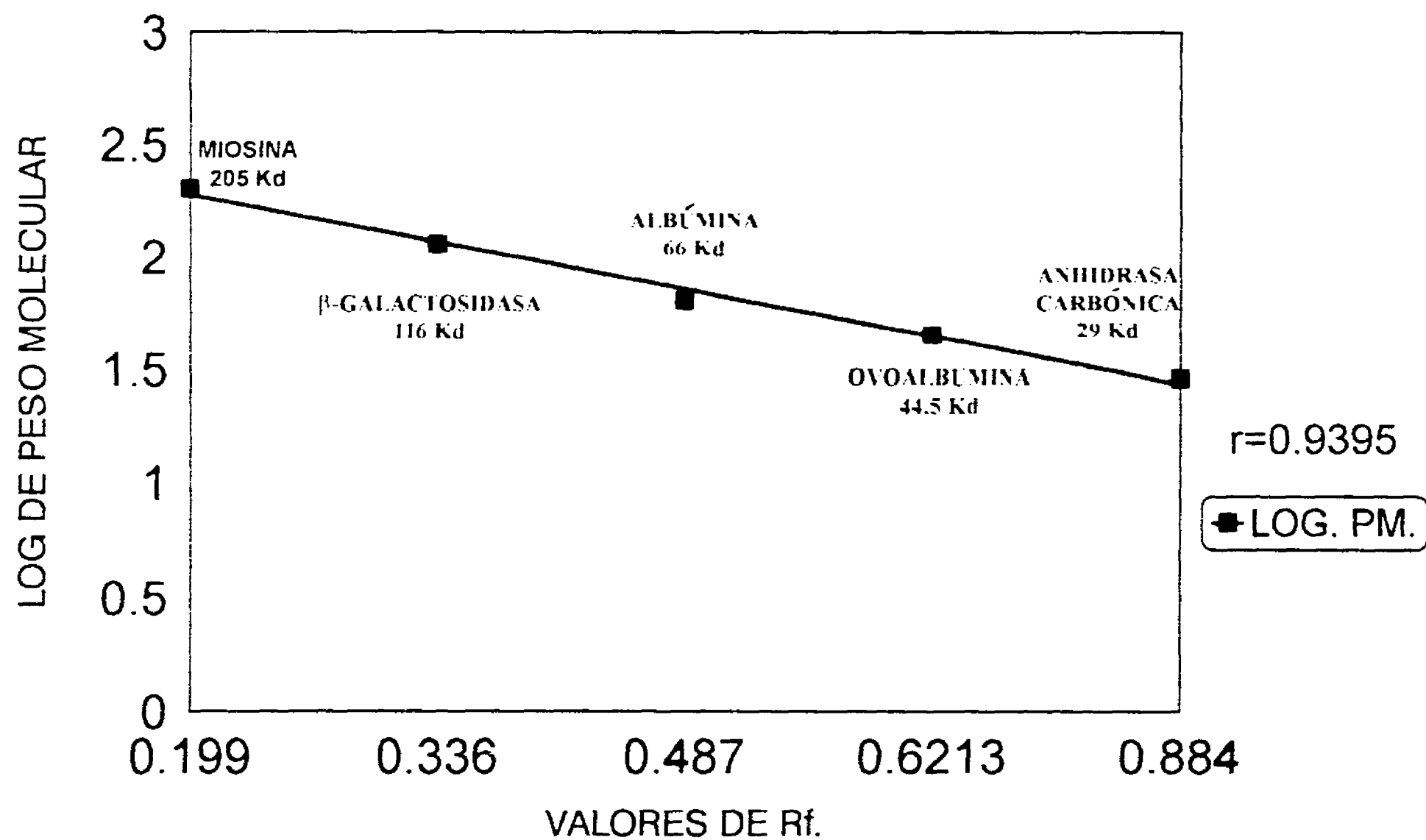
P.M.=Peso Molecular; Av,Bv,Cv="cepas" vacunales; De y Ec= "cepas" de campo, Fr="cepa" de referencia

FIGURA 4. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA CON "CEPAS" DE VFPC., TEÑIDO CON NITRATO DE PLATA



P.M.=Peso Molecular; Av,Bv,Cv="cepas" vacunales; De y Ec= "cepas" de campo, Fr="cepa" de referencia

GRAFICA 1. CURVA PATRÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE PESO MOLECULAR



CUADRO 2. PROTEINAS PRESENTES EN "CEPAS" DEL VFPC, MEDIANTE EL ESTUDIO DE PAGE CON NITRATO DE PLATA Y CONCAVALINA A*P.

Proteínas Reportadas en la LITERATURA	CEPA Av Minnesota		CEPA Bv PAV-1		CEPA Cv PAV-250		CEPA Dc 89-126		CEPA Ec 89-55		CEPA Fr ALD		Proteínas Presentes en varias CEPAS
	AgNO ₃	CON A	AgNO ₃	CON A	AgNO ₃	CON A	AgNO ₃	CON A	AgNO ₃	CON A	AgNO ₃	CON A	
	252.6		252.6		252.6 248.7		257.8						252.57 (Av,Bv,Cv)
	233.2		239.6				231.1					235.2	
	218.3		218.7		212.7							226.9	218.3 (Av,Bv)
	203.2		205.9		203.9		207.5	209.1	205.6		202.2 194.1		205 (Av,Cv,Fr) 203 (Bv,Dc)
	188.8		188.8		187.3	183.2	188.8		187.3 184.5		187.2		188.7-187.2 (todas, menos Ec)
	177.4						174.8		173.4 172.1		175.8		173-175 (Dc, Ec, Fr)
	168.2		169.5		169.8		169.5				168.7 165.7 160.3		168-169 (todas menos Ec)
	157.1		155.8				154.6		153.4		157.8 155.1		157-158 (Av, Cv) 156 (Av, Bv, Fr) 153-154 (Dc, Ec)
							152.3		151		152.5		152 (Dc, Ec, Fr)
	147.6	146.3	147.6		141.9 141.1		143.1				146.5 143.3		146-147 (Av, Bv, Fr) 142-143 (Bv, Cv, Fr)
	139.5 135.8		135.6		139.9								139 (Av, Cv) 135 (Av, Bv)
125 (Greiser-Wilke, 92)	131.9		126.6				131.5 128.7		128.5				131.5 (Av, Dc) 128.5 (Dc, Ec)
120 (Wenvoort, et al., 1990) 118 (Donis et al., 80) 116 (Collett et al., 88) 115 (Purchio, et al., 1984).	121.8 112.8		120.9 114.8				121.6 117 113.5	117	119.9 118.1 114.7 111.0		114.9 112.8		120- 122 (Av, Bv, Dc, Ec) 117-118 (Dc, Ec) 113-115 (Bc, Dc, Ec, Fr)

110 (Pitchett, et al., 1975)	107.7 106.4		107.7		110.9 106.7		108.5		106.8		108.7		107-109 (Av, Bv, Dc, Fr) 106 (Av, Ec, Cv)
					102.8		105.7 103.8		102.2		103.6 100.5		102-104 (Dc, Ec, Cv, Fr)
97 (Hulst et al., 1993) 90-93 (Pitchett, et al., 1975., Wenvoort, et al., 1990))			94.7 91.6		97.4 95.7 91.3		95.7 92.3		98.7		99 95.2 93.1		97-99 (Ec, Cv, Fr) 94-96 (Av, Bv, Cv, Fr) 91-93 (Bv, Dc, Cv, Fr)
89-87 (Wenvoort, et al., 1990)	89.6 88.8		87.4		87.2		89.6		88.2 87.5		87.6		87-89 (todas)
84 (Purchio, et al 84)	85.2				84 81.1		82.4	81.9		82.5	84.8 82.4		85 (Av, Fr) 84 (Cv) 82 (Dc, Ec, Fr) 81 (Bv, Fr)
80 (Purchio, et al., 1981., Greisser-Wilke, et al., 1992) 75 (Donis, et al. 84) 70-69 (Pitchett, et al., 75, Hulst et al, 93) 65 (Donis et al, 84, Enzmann & Weilan, 78) 62 (Collett et al, 88)			63.4		66.6 60.4		79.8 74.3	65.5	77.4	74.9	75.1 64.8 60.7		80 (Dc) 75-77 (Ec, Fr) 74 (Ec) 65-67 (Ec, Cv, Fr) 60-61 (Cv, Fr)

51-58 (Wenvoort, et al., 90) 56-65 (Wilke, et al, 90, , Donis, et al, 80) GP54-51 (Moormann et al.,90, Rijn et al., 93) 55-33 (Rümenapf, et, al., 91) 57 (Mathews,79) 55 (Purchio, et al. 80, Thiel, et al., 91) 53-54 (Collett et al, 88;	58.4		58.1	58.3	54.5		57 55.1	55.1	57.9		56.4	57.3	56-58 (todas) 54-55(Ec,Cv)
48 (Donis, et al, 80; Collett et al, 88) 44-48 (Thiel, et al, 91, Weiland et al, 92) 47 (Wenvoort, et al, 90, Hulst et al,93)	49.2	47.9					49.2			47.9			48-49 (Av, Dc, Ec)
44-46 (Wenvoort, et al, 90, Hulst, et al, 93, Mathews, 79) 45 (Purchio, et al., 80)	45.2												
42-39 (Wenvoort, et al.,90; Magar et al,88)	40.2												40 (Av)
38 (Wenvoort, et al, 90)	37.9		37.9		38.1		37.9		37.6	38.3			38 (todas)
35-32 (Wenvoort, et al., 90, 31-42 (Wenvoort, et al, 89ab) 33 (Thiel et al, 91)	34.5 33		34.9					35 33.5					34-35 (Av, Bv) 32-34 (Av, Ec)

31 (Hulst et al., 93; Wenvoort, et al., 1993) 30 (Enzman & Weilan, 78, Hulst, et al, 93)	31.2	30.6	30.9				30.5	30.6	30.8			<u>30.6</u>	31 (todas, menos Cv)
27-24 (Wenvoort, et al, 90)					<u>29.4</u> <u>27.5</u>	28.		26.8	26			28	26-29 (Bv, Ec, Cv, Fr)
26-25 (Pritchett, et al 75)	25.4	24.5	24.5				24.2	24.2					25(Av, Bv, Dc)
24-23 (Pritchett, et al. 75, Rūmenapl, et al., 89, 91)				<u>22.4</u>	23.8		23	21.4		<u>21.4</u>		<u>23.4</u>	21-23 (Bv, Dc, Ec, Cv, Fr)
19 31-19 (Wenvoort, et al, 90) 14 (Thiel, et al., 91)	? 19.7	20.5	? 20.5	20.5	? 20.5								21 (Av, Bv, Cv)

"cepas" vacunales (v): Av= Minnesota; Bv= PAV-1 y Cv=PAV-250; "cepas" de campo: Dc=89-126 y Ec=89-55 y "cepa" de referencia Fr=ALD. El resultado de la diferencia entre geles es de 2.6 K. Los números remarcados en negro, son las proteínas que son específicas de cada cepa.. El signo de interrogación (?) y los números subrayados, quieren decir que esos bandeos no se encontraron en los geles que tiñeron con nitrato de plata, pero sí aparecieron cuando se hizo la tinción con la Concanavalina A-^{*}P= Peroxidada; los números quieren decir el peso molecular que presentaron las "cepas" del VFPC.

Las "cepas" vacunales Minnesota; PAV-1 y PAV-250, marcadas en la última columna del Cuadro 2 marcadas con letras Av, Bv y Cv, respectivamente,, mostraron proteínas comunes como fue la 252.6K que no está presente en las "cepas" de campo (Dc y Ec), ni en la de referencia (Fr). La proteína 60 solo esta presente en la "cepa" Cv y Fr; La proteína 34 está presente en la "cepa" Av y Bv, y la proteína 33 está presente sólo en la "cepa" Av y Dc; la "cepa" Cv no mostró la proteína 31 K, la "cepa" Cv y la Fr no tiene la proteína 120.

Las "cepas" de campo Dc y Ec (89-126 y 89-95) comparten la proteína la 152 K y ésta no está en la vacunales, pero sí se encuentra en la cepa de referencia. La proteína 82 K está presente en Dc, Ec y Fr pero no en las vacunales. La proteína 65-67, 74 estan presentes en las "cepas" Dc, Ec y FR, pero no en Av, Bv y Cv, la "cepa" Ec no tiene la proteína 168-169; 142-143, ni la 135-139.

Existen proteínas comunes a todas las "cepas" como son (188.7-187.2; 87-90) que pueden ser descartadas desde un principio, si se pretendiera encontrar diferencias.

Con respecto al muestreo serológico de algunos estados de la República Mexicana, se obtuvieron de **SONORA**: 21 sueros de animales de una granja de Hermosillo, Sonora. De **GUANAJUATO**: Se obtuvieron 22 sueros de Irapuato, Gto., **YUCATÁN**: Se obtuvieron 23 sueros de una granja de Mérida Yucatán. Finalmente de **Animales experimentales**, se obtuvieron 21 sueros de animales vacunados con la vacuna PAV-250 y desafiados con la "cepas" de referencia AMES (Correa, 1992).

En el Cuadro 3 se pueden observar los resultados de la serología de las muestras obtenidas en las diferentes zonas del país, en las que se está aplicando la campaña de erradicación de la FPC y los porcentajes de animales que resultaron positivos. Donde Sonora muestra 10 animales positivos de un total de 21 (47.62%), de Irapuato 11 animales de 22 (50%), de Yucatán 9 animales de 23 (39.13%), de los animales desafiados 11 animales de 18 (61.11%) y finalmente de los controles resultaron 0 de 3 (0%).

En el Cuadro 4, podemos observar lo siguiente: las "cepas" vacunales: Av, Bv y Cv, mostraron mayor reactividad con los sueros de Yucatán. Pero la cepa Cv reacciono el 100% ante los sueros de Guanajuato. La cepa de campo Dc, mostró reactividad semejante con los sueros de Yucatán, Sonora, Guanajuato y Desafiados. Para la otra cepa de campo Ec, reaccionaron más los sueros de Guanajuato, y finalmente, con respecto a la "cepa" de referencias Fr, los sueros que tuvieron mayor reactividad fueron los de Guanajuato y de semejante forma pero con un porcentaje más bajo los sueros de Yucatán y Sonora.

CUADRO 3.- SUEROS DE ANIMALES DE DIFERENTES ZONAS DEL PAÍS QUE REACCIONARON A LAS GLICOPROTEÍNAS Y/O PROTEÍNAS DEL VFPC.

ESTADO	ANIMALES POSITIVOS/TOTAL	%POSITIVOS
SONORA	10/21	47.62
GUANAJUATO	11/22	50.00
YUCATAN	9/23	39.13
DESAFIADOS	11/18	61.11
CONTROLES	0/3	0

CUADRO 4.- PORCENTAJES DE SUEROS PROCEDENTES DE ANIMALES DE DIFERENTES ZONAS DEL PAÍS POSITIVOS A LAS 6 "cepas" DEL VFPC.

ESTADO	"cepa" Av	"cepa" Bv	"cepa" Dc	"cepa" Ec	"cepa" Cv	"cepa" Fr
YUCATÁN	66.6	44.44	9.09	2.22	60	60
SONORA	30	60	10	11.11	55.55	66.6
GUANAJUATO	27.27	27.27	9.09	27.27	100	72.72
DESAFIADOS	5.5	16.16	11	11	44.4	44.4
CONTROLES	0	0	0	0	0	0

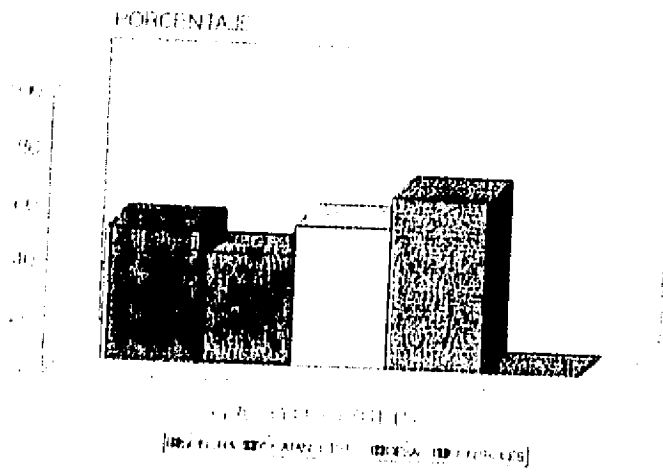
En la Gráfica 2 se muestra el porcentaje de sueros que fueron positivos al virus de la FPC, de los cuales que fueron muestreados en las diferentes zonas (Sonora, Yucatán, Guanajuato, Desafiados y Controles). En la Gráfica 3 se muestra el porcentaje de sueros positivos al virus de la FPC por cepa (Av, Bv, Cv, Dc, Ec y Fr) en las diferentes zonas de estudio. En la Gráfica 4, se muestra el porcentaje de sueros positivos al virus de la FPC ("cepa" Av) de los grupos de estudio. En la Gráfica 5, se muestra los sueros positivos de las diferentes zonas ante la "cepa" Bv.

En la Gráfica 6 se muestran los sueros positivos de las diferentes zonas a la "cepa" Dc. En la Gráfica 7 se muestran los porcentajes de los sueros positivos al virus de la FPC a la "cepa" Ec. En la Gráfica 8, se muestra el porcentaje positivo al virus de la FPC a la "cepa" Cv. En la Gráfica 9 se muestran los porcentajes seropositivos al virus de la FPC, "cepa" Fr. En la gráfica 10, 11, 12 y 13 se muestran los porcentajes de sueros positivos al virus de la FPC ante 6 "cepas" en los estados de Yucatán, Sonora, Guanajuato, y Desafiados.

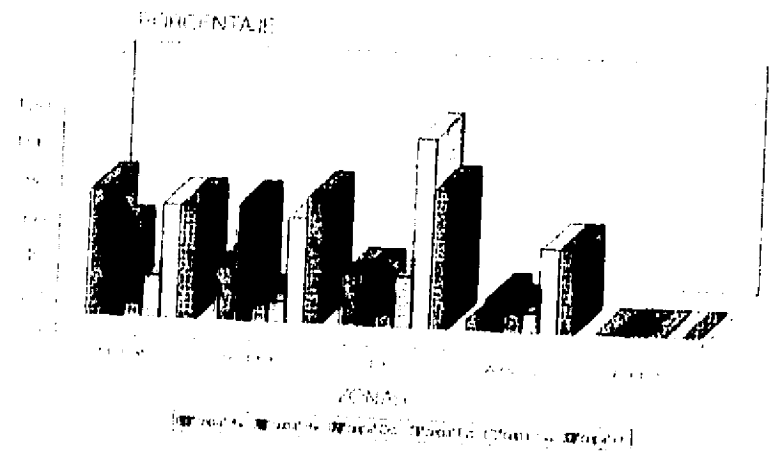
El Cuadro 5 nos muestra las proteínas que se detectaron en los sueros de diferentes lugares, por medio de la prueba de Inmunotransferencia, usando como substrato el 1-4-Cloro naftol.

En la Figura 6, se observan 6 carriles con las tiras de papel Inmobilón-P, a las que se les realizó la técnica de Inmunotransferencia con VFPC contra diferentes sueros. Cada cepa está representada por su tira de nitrocelulosa, la cepa Av (Minnesota), Bv (PAV-1), Cv (PAV-250) que fueron las "cepas" vacunales; Dc (89-126) y Ec (89-55), y "cepas" de campo y la Fr (ALD) fue la cepa de Referencia. En el inciso a) las tiras teñidas con Concanavalina A, observamos con la cepa Av (5 bandas), cepa Bv (3 bandas), para la cepa Cv (3 bandas), para la Dc (10 bandas), Ec (4 bandas) y para Fr (4 bandas), el peso molecular estandar (PM) presentó (4 bandas). En el caso b, correspondiente al suero del cerdo desafiado "O": para la "cepa" Bv, (1 banda) y la Cv (2 bandas), el resto de las "cepas" no mostró ninguna banda. Para el caso c) suero de Sonora (210), se observó que la cepa Av mostraba (2 bandas), la Cv (2 bandas) y la Fr (7 bandas). El caso d) suero de Guanajuato (e) mostró para la cepa Cv (5 bandas) y para Fr (6 bandas). Para el caso e) suero de Yucatán (12), mostró para la cepa Av (3 bandas), para la cepa Cv (9 bandas) y Fr (2 bandas). Finalmente para el caso f) el suero de cerdo SPF, no mostró ninguna reacción.

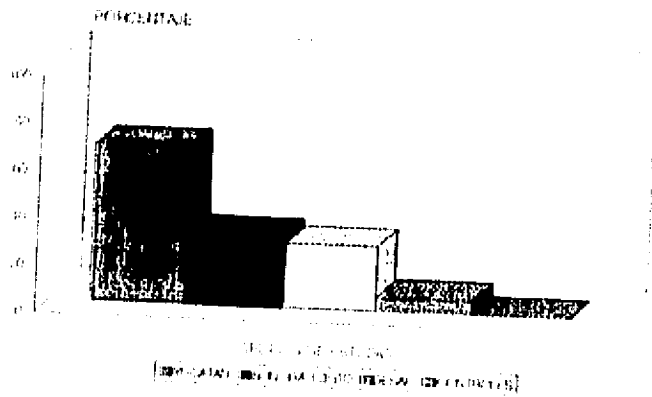
GRAFICA 3. PORCENTAJES DE SUEROS POSITIVOS AL VIRUS DE LA FIEBRE EN DIFERENTES ZONAS



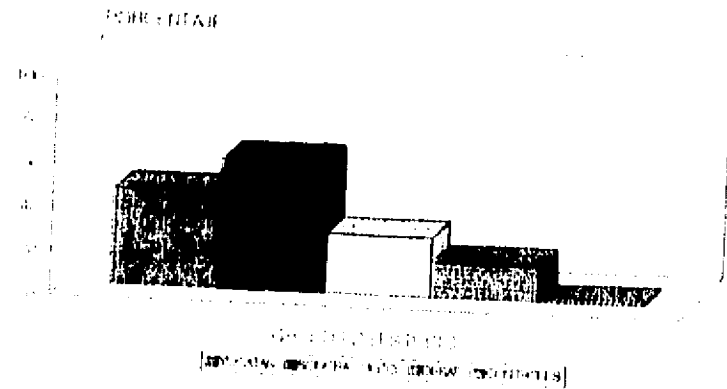
GRAFICA 4. PORCENTAJES DE SUEROS POSITIVOS AL VIRUS DE LA FIEBRE EN DIFERENTES ZONAS



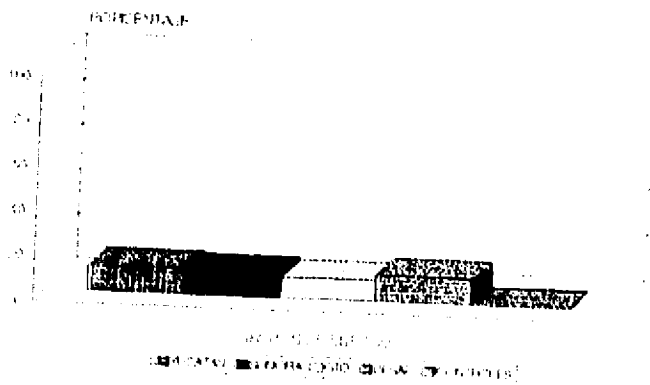
GRAFICA 4. PORCENTAJES DE SUEROS POSITIVOS AL VIRUS DE LA FIEBRE EN DIFERENTES ZONAS



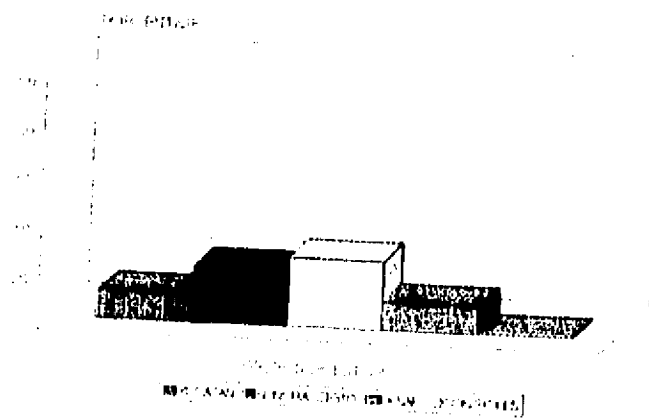
GRAFICA 5. PORCENTAJES DE SUEROS POSITIVOS AL VIRUS DE LA FIEBRE EN DIFERENTES ZONAS



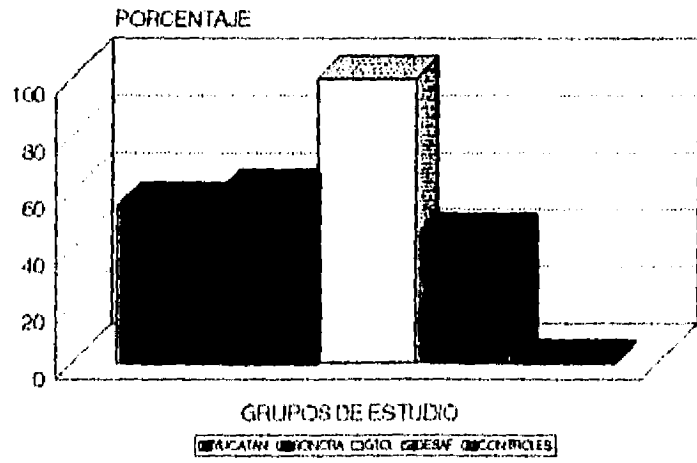
GRAFICA 6. PORCENTAJES DE SUEROS POSITIVOS AL VIRUS DE LA FIEBRE EN DIFERENTES ZONAS



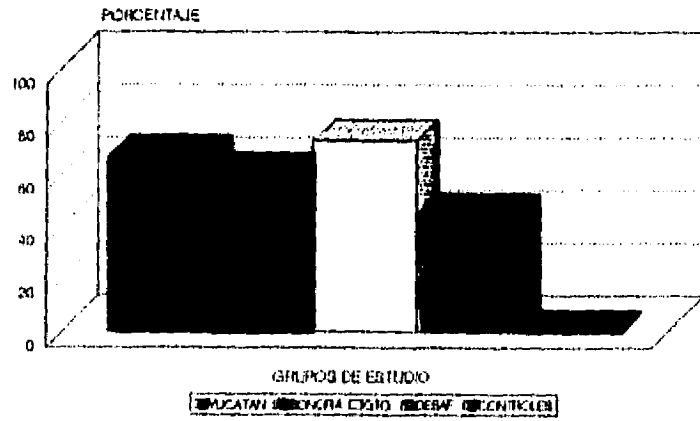
GRAFICA 7. PORCENTAJES DE SUEROS POSITIVOS AL VIRUS DE LA FIEBRE EN DIFERENTES ZONAS



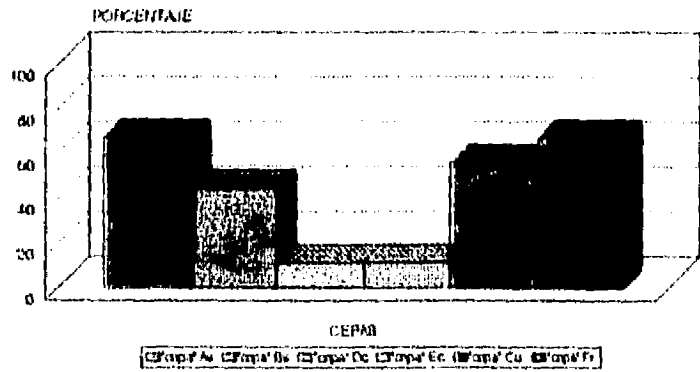
GRAFICA 8. PORCENTAJES DE SUEROS POSITIVOS AL VIRUS DE LA FPC A LA "cepa" Cu



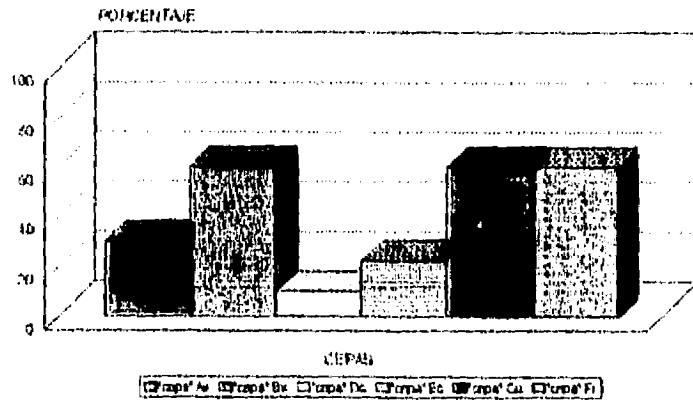
GRAFICA 9. PORCENTAJES DE SUEROS POSITIVOS AL VIRUS DE LA FPC A LA "cepa" Fr.



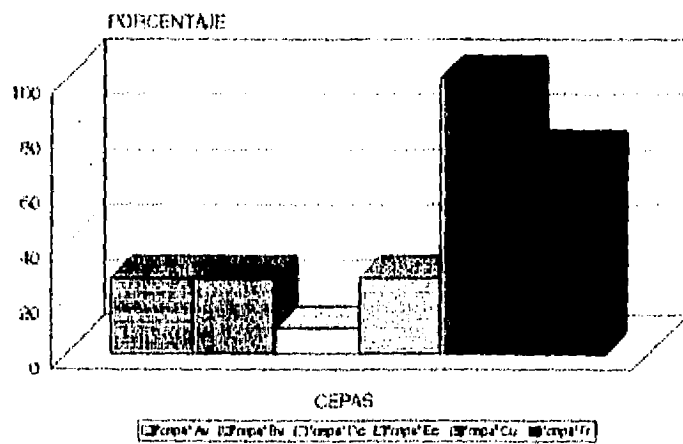
GRAFICA 10. PORCENTAJES DE SUEROS POSITIVOS AL VIRUS DE LA FPC EN YUCATAN



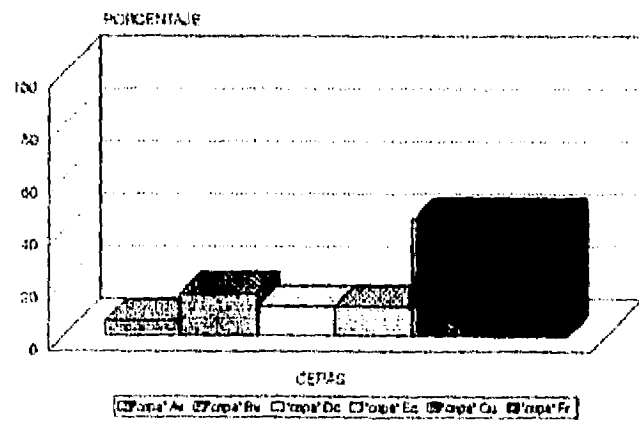
GRAFICA 11. PORCENTAJES DE SUEROS POSITIVOS AL VIRUS DE LA FPC EN SONORA



GRAFICA 12. PORCENTAJES DE SUEROS POSITIVOS AL VIRUS DE LA FPC EN GUANAJUATO



GRAFICA 13. PORCENTAJES DE SUEROS POSITIVOS AL VIRUS DE LA FPC. EN LOS CERDOS DESAFIADOS



CUADRO 5. FRACCIONES CONTRA LAS QUE REACCIONARON MEDIANTE INMUNOTRANSFERENCIA, DIFERENTES SUEROS CONTRA LAS "CEPAS" DEL VFPC.

	CEPA b	CEPA b	CEPA b	CEPA b	CEPA b	CEPA Fr
(-)SON		36.64 29.30 21.44			18.30 28.02	28.02
25 (SON)				23.44 21.44	29.3	28.02 20.5
70		32.04 30.64			26.8 23.44	
272					89.5 71.58 49.81 41.88 26.8	23.44
147		30.64				24.51
ETHA		29.3 21.44			52.37 30.64 26.8	30.64
210	32.04 29.3				29.3 25.63	117.01 81.86 71.58 45.8 16.64 29.51 24.51
265		218.66 23.44 22.41				
141	210.02	117.61	90.62		29.11	
270	44.37 36.9 21.22				16.9 25.52	210.02
F (Ira)			174.88 20.5		26.8 20.5	24.51 22.41 20.5
w		32.04 30.64 26.8			36.6 26.8	
S		209.08 28.02 22.41			209.08 28.02 22.41	24.51
a-l	23.44 21.44					81.86 78.27 71.58 68.46 38.3 35.03 26.8
V				143.63	47.89 43.80 29.3 26.8	133.77 117 28.02
d	-	-	-	-	-	-
q	-	-	-	-	-	-

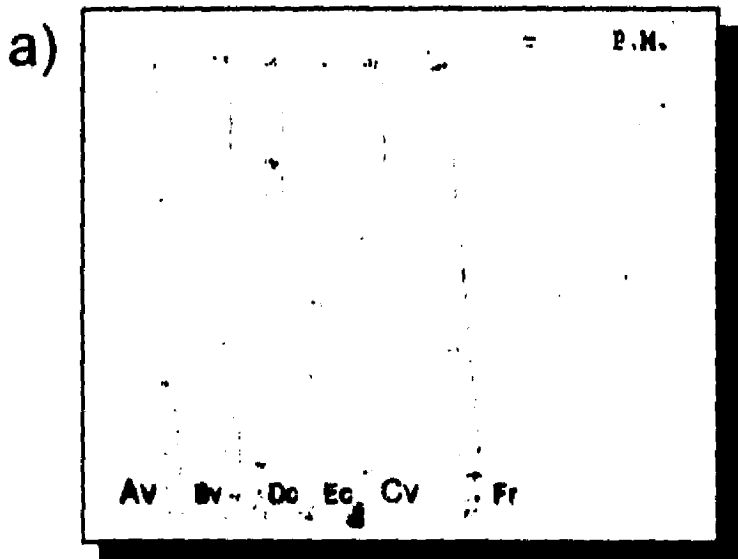
e	-	-	-	-	165.68 89.51 43.73 26.90 25.52	80.5 75.64 68 44.90 28.35 28.21
q*	-	-	-	71.3 22.37	120.77	
X	-	-	-	-	44.37 25.52	
t		199.24 33.21 28.35 24.21			111.59 36.9 26.9	20.67
b*	36.9 35.0 24.21	-	-	22.37 20.67	33.21 26.9	199.24 26.9
m	-	nd	22.37-21.22	-	-	-
RESERVA PARA IMPREVISTOS						
O (DESAF)		36.64			29.3 19.91	
6		218.66 29.3 24.51 22.41 21.44	22.24 21.44		228.62 25.63	74.86 24.07
S/N						32.34
21X			44.37 23.58		199.24 90.38 79.22 28.35 25.52	57.75 50.62
SN1	-	-	-	-	-	-
838	-	-	-	-	-	165.68 35.0
R-91	-	-	-	28.35	28.35 26.9	22.37 20.67
838*	189.01	-	-	-	29.11 21.22	
n	-	-	-	174.65 75.16	26.9 20.67	-
938	21.22	ND	22.37 20.67	-	42.09	32.34 28.35 24.21
S-HIPER	-	ND	-	-	199.24 174.65 59.29 50.62 22.37	39.93
SPE	-	ND	-	-	-	-
FCO	-	-	-	-	103.11 51.97 26.9 22.37	42.09 37.88

resto	-	-	-	-	-	-
w		32.04 30.64 26.8	16982		36.6 26.8	
S		209.08 28.02 22.41	141905141111		209.08 28.02 22.41	2451
a-l	23.44 21.44					81.86 78.27 71.58 68.46 38.3 35.03 26.8
V				14363	47.89 43.80 29.3 26.8	133.77 117 28.02
12	57.26 24.51 21.34				174.88 50.08 40.06 34.40 28.02 24.02 23.44 22.41 20.50	29.3 21.44
d	-	-	-	-	-	-
q	-	-	-	-	-	-
q*	-	-	-	71.3 22.37	12077	23442
X	-	-	-	-	44.37 25.52	
t		199.24 33.21 28.35 24.21			111.59 36.9 26.9	20.67
b*	36.9 35.0 24.21	-	-	22.37 20.67	33.21 26.9	199.24 26.9

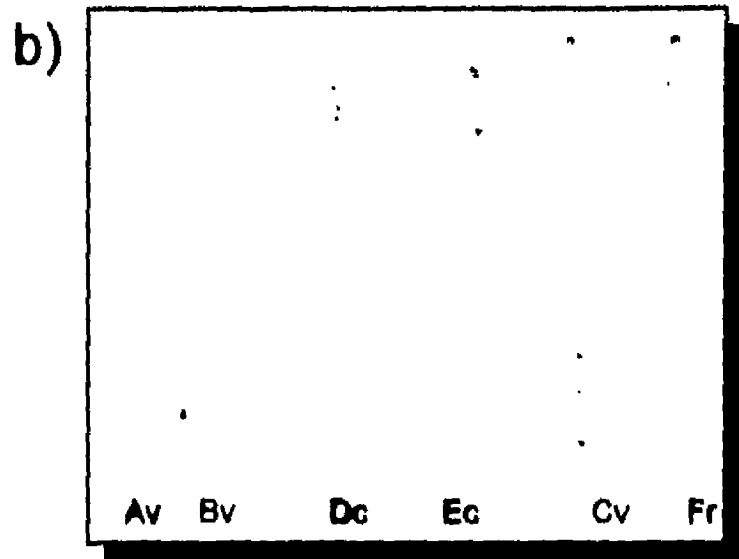
Av; Bv; Cv: "cepas" vacunales (Minnesota; PAV-i, PAV-250, respectivamente) Dc y Ec: "cepas" de Campo (89-126 y 89-55) y Fr: "cepa" de Referencia (ALD).

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

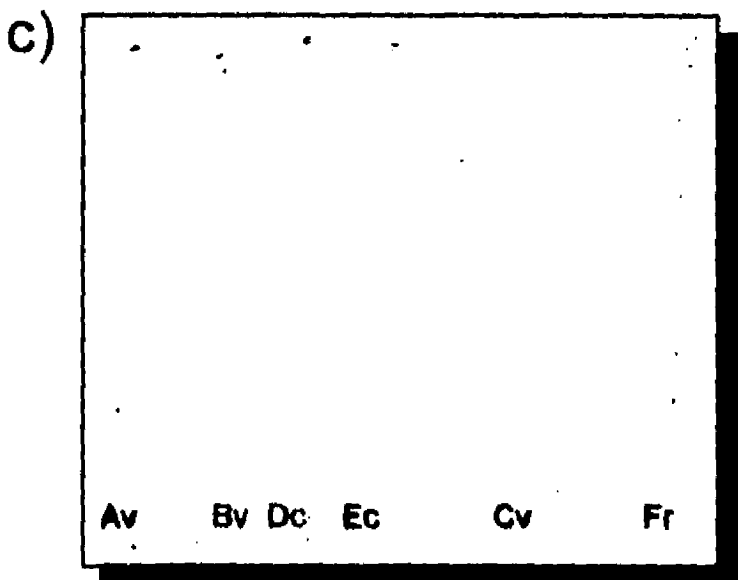
FIGURA 6. INMUNOTRANSFERENCIA DE VFPC. CONTRA DIFERENTES SUEROS



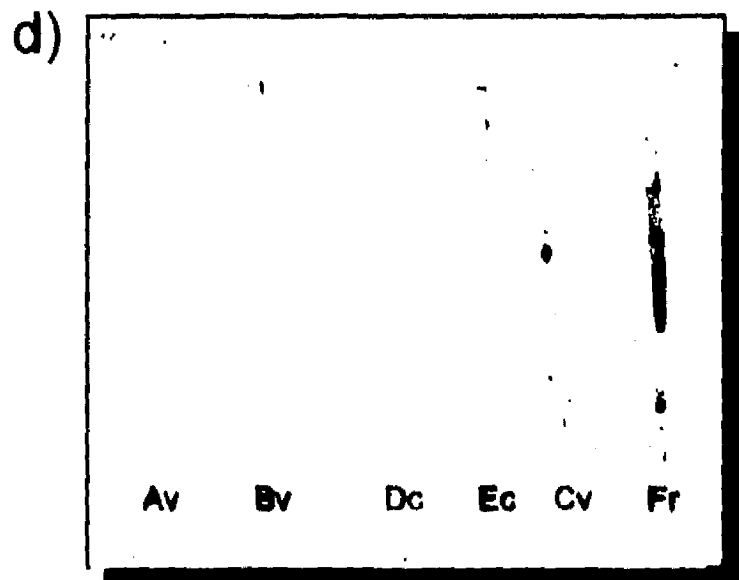
CONCAVALINA Y PESO MOLECULAR



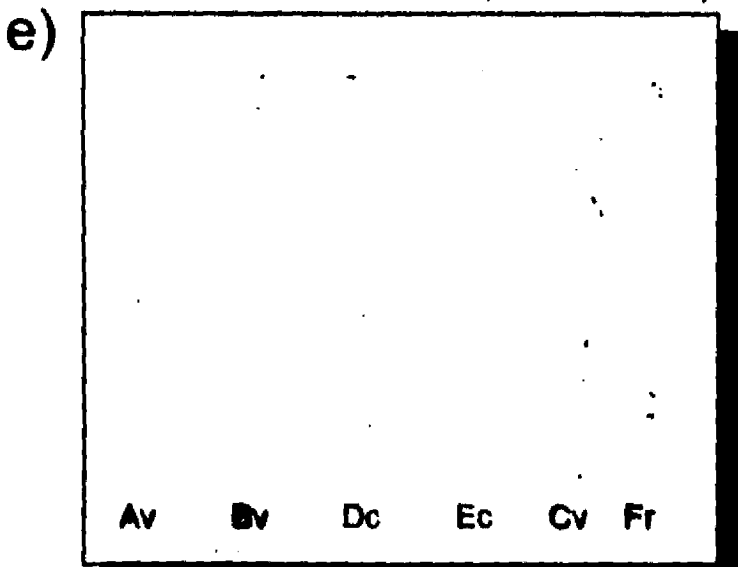
CERDO DESAFIADO (SUERO '0')



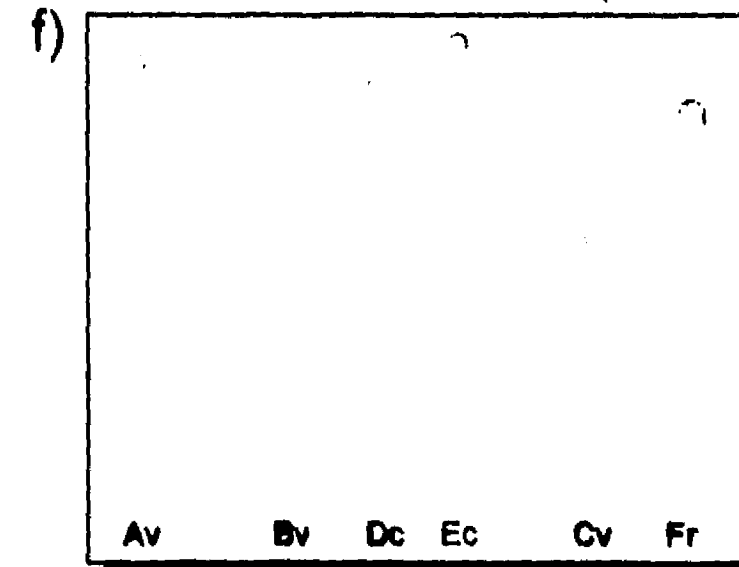
CERDO DE SONORA (SUERO 210)



CERDO DE GUANAJUATO (SUERO e)



CERDO DE YUCATÁN (SUERO 12)



SUERO DE CERDO S.P.F.

Av., Bv., Cv., = "CEPAS" VACUNALES. Dc., Ec., = "CEPAS" DE CAMPO
Fr., = "CEPA" DE REFERENCIA.

6.0. DISCUSION

En el Cuadro 1 se observan los resultados obtenidos a través de los estudios anteriores, mostrando los datos de las fracciones seleccionadas de cada "cepa" que fueron estudiadas por medio de la técnica de Microscopía Electrónica de Transmisión, en el Capítulo 4, se lograron visualizar viriones completos, incompletos, cápsides, peplómeros, etc, por lo que el siguiente paso fué estudiar que tipo de proteína ó glicoproteína presentaba cada fracción

En un trabajo previo, Wensvoort, 1989, mostró que los sitios neutralizantes AcMs del 1 al 8, estaban dirigidos contra los dominios antígenicos A1, B o C. Los resultados obtenidos en este capítulo fueron los mismos, en los cuales AcMs fueron 5, 6, y 8 en términos generales. Los sitios no neutralizantes de los MABs del 9 a 13, fueron dirigidos contra los dominios A2, A3 o D. Con respecto a los resultados, algunas "cepas" fueron positivas al AcMs 13, pero en forma muy debil y no importante. Estos dominios antígenicos fueron topográficamente distintos en unión competitiva al realizar estudios de captura del antígeno. En el estudio realizado por Weenvoort y cols. (1990), se muestra que en la neutralización, AcMs reacciona con E1 en condiciones reducidas en inmunotransferencia, mientras que los otros MABS generalmente no. También se demostró que la E1 no siempre esta glicosilada y puede una diferencia de 3K, entre gp51 y gp54, también se asume que la cadena de polipéptidos de E1 contiene un sitio X, donde un glicán adicional puede estar anclado. El sitio de anclaje proteolítico fue diseñado para investigar los dominios importantes en E1, Tanto B y C, como el sitio X que fueron localizados en la E1; el anclaje de E1 usando la proteasa V8 produjo 5 fragmentos glicanos orientados a derivarse de gp54; y 5 derivados de la gp31, del par original gp54-gp51 se detectaron 3 pares de fragmentos (de 42k a 49k, de 35k a 32k y de 27k a 24k) el cual contiene un sitio X y dos pares (de 31k y de 19k) los cuales fueron glicosilados pero no se les encontró el sitio X, todos los fragmentos excepto el 19k están contenidos en el dominio A1, que reaccionan con los AcMs 2, 3, 4, y 7. Únicamente los fragmentos 35k y 32k están contenidos en los dominios B y C que reaccionan con los AcMs 1, 5, 6 y 8, los dominios B y C están localizadas a "alguna" distancia del dominio A1.

Las proteínas que se obtuvieron de estos resultados concuerdan con la literatura, como ya se mencionó anteriormente; la diferencia de Kd que marca Weenvoort y cols., (1990), concuerda con lo observado en este estudio, sólomente que en estos resultados fue de 2.6 K entre cada gel.

La banda de 31K, fue observada, gracias a la tinción de nitrato de plata donde se tiñieron algunas bandas de color verde y en algunas ocasiones de color grisácea, correspondientes a las glicoproteínas, sin embargo, sólo corrió el 50% del gel, probablemente por falta de tiempo o por el tipo de gel. De aquí podemos concluir que la mejor tinción para observar tanto a las proteínas como a las glicoproteínas del virus fue la tinción con Nitrato de Plata, con la cual se visualizan claramente las bandas. Con respecto a la tinción con Azul de Coomassie, nos da una idea del bandeo que tenemos, pero nunca tan fino como con la tinción con nitrato de plata. Así de las últimas Figuras (3 y 4), partiendo de las transparencias de los geles claros se proyectaron en papel para medir adecuadamente los RF y se hizo un promedio de todos los geles que se repitieron. Posteriormente se obtuvieron los resultados de todas las "cepas" con las tinciones, que se muestran en el Cuadro 2, donde se observan los PM para cada "cepa". Cabe mencionar que los PM se calcularon mediante el RF y regresión lineal, para las seis "cepas" del VFPC. Los PM que se observaron en cada "cepa" son los importantes y los reportados para el VFPC (Wenvoort *et al.*, 1989), como son las proteínas estructurales, E1, E2, C, proteínas de cápside y la proteína 31 K.

Las glicoproteínas presentes en la tinción con ConA*P, no se presentan en la tinción con Nitrato de plata. Esto se puede explicar porque, primero se encontraba en baja concentración, siendo más sensible el método de la ConA*P, o que existió dispersión en el gel mientras se corrían las muestras por el cambio de voltaje (muy frecuente), por lo que se pudieron observar proteínas con diferencias de 1 o 2 K; pero además entra dentro de lo aceptable por la variación obtenida entre gel y gel con estos resultados (2.6 K). Las condiciones de trabajo fueron diferentes, a las del grupo de Holanda, donde sólo realizaron la tinción con azul de Coomassie, mientras y en este estudio se trabajó con geles de poliacrilamida al 7.5%, teñidos con azul de Coomassie y Nitrato de Plata. Estos resultados se contraponen con los datos de Collett y cols., (1988) que demostraron que la gp53 de VDVB contiene cuatro sitios potenciales de glicosilación linked-N, la diferencia fue de 4 K a 7 K, lo que concuerda también con los resultados de Weenvoort *et al.*, (1990), diferencia que observaron entre E1 y su columna estructural deglicosilada. Las condiciones de trabajo fueron diferentes, ya que ellos trabajaron con geles de poliacrilamida al 10% y al 12% teñidas sólomente con azul de Coomassie.

En los bloques presentados en los resultados, observamos que el orden de frecuencia con que aparecieron las "cepas" fue la "cepa" Av (25 veces), la "cepa" Bv (24 veces), la "cepa" Dc (23 veces); la "cepa" Ec (24 veces), la "cepa" Cv (22 veces) y la "cepa" Fr (27 veces). Con respecto a las proteínas que son únicas de algunas "cepas", estas pudieran ser utilizadas para su identificación y diferenciación.

Las "cepas" vacunales Av, Bv y Cv (Minnesota, PAV-1 y PAV-250), mostraron proteínas comunes, como fue la 252.5K, que no está presente en las "cepas" de campo, ni en la de referencia. La proteína 60 sólo está presente en la cepa Cv y Fr; 32 y 34 están presentes en la cepa Av y Dc, la cepa Cv no mostró la proteína 31 K, la "cepa" Cv es la única que no tiene la proteína 120.

Las "cepas" de campo Dc y Ec (89-126 y 89-95) comparten la proteína 152 Kd y ésta no está en las vacunales; pero sí se encuentra en la cepa de referencia. La proteína 82 K está presente en Dc, Ec y Fr, pero no en las vacunales. La proteína 65-67, 74, están presentes en las "cepas" Dc, Ec y Fr, pero no en Av, Bv y Cv; la cepa Ec no tiene las proteínas 168-169; 142-143.

Existen proteínas comunes a todas las "cepas" como son: 188.7-187.2 y 87-90, que pueden ser descartadas desde un principio.

Con respecto a la bibliografía consultada la proteína de 125 reportada por Greisser-Wilke (1992), en los resultados obtenidos no la presentó ninguna de las 6 "cepas". Con respecto a las proteínas de 120: (Wenvoort *et al.*, 1990; 118), (Donis *et al.*, 1988), y 115 (Purchio *et al.*, 1984), en los resultados obtenidos todas las "cepas" presentan estas proteínas a excepción de la cepa **Pav-250**. La proteína 110 (Pritchett *et al.*, 1975), sólo la presenta la Cepa **Pav-250**. La proteína 97 (Hulst *et al.*, 1993) y la 90-93 (Pritchett *et al.*, 1975), todas las "cepas" la presentaron, a excepción de la cepa **Minnesota**. Las proteínas 89-87 reportada por Wenvoort *et al.*, 1990), concuerdan con nuestros resultados para todas las "cepas". La proteína 84 (Purchio *et al.*, 1984) sólo la presentó la **PAV-250**. La proteína 80 (Purchio *et al.*, 1984), la presentó sólo la cepa de **campo** (Dc); la proteína 75 (Donis *et al.*, 84) solo la presentaron las "cepas" de este estudio (Ec y Fr); las proteínas 70-69 (Hulst *et al.*, 1993), no la presentaron ninguna de las "cepas", las proteínas 51-58; 56-65; gp54-51; 55-33; 57, mayoritariamente reportadas por muchos autores ya mencionados, concuerdan con los resultados obtenidos, ya que todas las "cepas" presentaron estas proteínas. La proteína 48 ; 44-48 (Donis *et al.*, 1984; Weiland, *et al.*, 1992; Thiel *et al.*, 1992) sólo concuerda con las "cepas" Av; Dc y Ec. Las proteínas 44-46 y 45 reportadas por varios autores, concuerdan con todas las "cepas" a excepción de la cepa Av. Las proteínas 42-39 y la 38, reportadas por Wenvoort *et al.*, 1990, sólo la cepa Av las presentó. Las proteínas 31-42; 35-32 y 33 (Wenvoort *et al.*, 1990; Thiel *et al.*, 1991), sólo la presentan Av y Dc. La proteína 30-31 (Enzmann y Weiland; 1978; Hulst, *et al.*, 1993 y Wenvoort *et al.*, 1990) concuerdan los datos obtenidos.

Las tres proteínas específicas de FPC de 90K, 70K 54K, 51K y 31K, fueron detectadas por el SDS-PAGE bajo, condiciones reductoras, cuando las fracciones fueron tratadas con un detergente no iónico NP-40..

Las transferencias al ser teñidas con la tinción con Con-A*P mostraron las glicoproteínas gp54 y gp 51 y gp 31 principalmente, los resultados concuerdan con los de Weenvoort, 1989, a excepción de que ellos detectaron a la gp 31, probablemente porque la detectaron con anticuerpos monoclonales, mientras que en este trabajo fue hecho con anti-IgG peroxidada. Por otro lado quizá exista otra explicación que aún después de purificar siga cruzando con DVB.

Estos resultados nos muestran que los sueros que reaccionaron a las "cepas" 3 y 4 de campo, no reaccionaron de igual manera a la de referencia y a las vacunales. Esto puede descartar la posibilidad de que las "cepas" de campo sean derivados de vacunas, mientras que la cepa a la que más reaccionaron los sueros fue a la cepa Cv (vacuna-PAV-250). Por otro lado, se encontraron bandas no reportadas con anterioridad. En el perfil electroforético de las "cepas" se encontraron proteínas que al parecer son propias a las "cepas" de campo, por lo que esta información puede ser de vital importancia para tomarlas como marcadores y poder diferenciar anticuerpos vacunales de los anticuerpos infectantes, lo cuál podrá ser investigado en trabajos posteriores.

Con respecto a los sueros de Sonora, no se encontró una respuesta asociada a las "cepas" patógenas de campo, exceptuando los sueros donde se encontró respuesta solamente en contra de las bandas de 23Kd y 51Kd, que corresponde a proteínas comunes a todas las "cepas" vacunales y a las de referencia. Las fracciones contra las que se encontró mayor índice de respuesta fueron las de 118,72,38,37, 32, 31, 29, 28, 27,25,23 y 21 Kd, que corresponden a lo reportado por Wenvoort, (1990), y por otros autores; sin embargo, se encontraron reacciones aisladas en contra de las fracciones de 210 y 219 Kd, las cuales no se encuentran reportadas con anterioridad. Con respecto a los sueros de Guanajuato, se encontró una reacción importante contra una de las "cepas" patógenas de campo, a las 2 vacunales y a la de referencia. Los principales bandeos fueron para la fracción 209*, 199*,71*,72*,48,49*,44,37,33-35,28,27,24-26,23,22, 21, de las cuales, las marcadas con un asterisco no se encuentran reportadas en la literatura.

Con respecto a los sueros de Yucatán, las bandas reaccionaron moderadamente en contra de las "cepas" de campo y el bandeo fue el siguiente 210*,175*, 68,69,51,44-46,37,33-34,26-29,23,24,22 y 21, de los cuales no se encuentran reportados los marcados con(*). Los animales desafiados presentaron reacción a las fracciones, 175*,75,51,42, 29,28, 27,24,22,21, el suero hiperinmune mostró el bandeo sólo a la "cepa" Cv y muy poco a la "cepa" Fr que fueron a las bandas 199*, 175*, 103*,59*,51,42, 40*,38, 27 y 22.

Otro punto importante es que las bandas que se detectaron en los sueros de Sonora, pudieran corresponder algún otro pestivirus: VDVB o el VEF, que pudiera estar dando una reacción cruzada, con estos estudios realizados con el VFPC, los bandeos también pudieran corresponder a animales que fueron infectados con otros pestivirus, ya que esa área es una zona libre de FPC, en la cual no se tendrían que encontrar anticuerpos vacunales.

8. BIBLIOGRAFIA

Biront, P., Leunen J., Depierreux, R., Vandavelde A., Pastoret , P.P., Dewaele A. (1993): La peste porcine classique transmission et prophylaxie. *Ann. Med. Vet .* (127): 547-563.

Bloemraad,M. (1989). Detection and differentiation of pestiviruses isolated from pigs in the framework of Hog Cholera diagnosis. Laboratory manual of diagnostic procedures for Hog Cholera (Classical Swine Fever). Central Veterinary Institute. Lelystad, The Netherlands.

Collett, M.S., Larson, R. Gold,C., Strick, D., Anderson, D.K. and Purchio, A. (1988) Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus Bovine Viral Diarrhea. *Virology* 165, 191-199.

Collett, M.S., Moening, V. & Horzinek, M.C. (1989). Recent advances in pestivirus research. *Journal of General Virology* 70, 253-266.

Donis, O.R. & Dubovi, E.J. (1987). Glycoproteins of Bovine Diarrhoea Virus-Mucosal disease virus in infected bivine cells. *Journal of General Virology* 68, 1607-1616.

Donis, O R., Corapi, W. & Dubovi (1988). Neutralizing monoclonal antibodies to Bovine Diarrhoea Virus bind to the 56K to 58K glycoprotein, *J. Gen. Virol.* 69: 77-86.

Enzmann, P.J. & Weiland, F. (1978). Structural similarities of Hog Cholera virus with togaviruses. *Archives of Virology* 69, 77-78.

Greiser-Wilke. , Dittmar,k., Moening V. Heterogeneous expression of the non-structural proteins p80/p125 in infected cellas with different. *Journal of General Virology* (1992) 73:47-52.

Hawkes, R. (1982). Identification of concanavalin A-binding proteins after sodium dodecyl sulfate-gel electrophoresis and protein blotting. *Analytical Biochemistry* 123, 143-146.

Hulst,N.M., Westra,F., Wenvoort, G. and Moormann, R. (1993). Glycoprotein E1 of Hog Cholera virus expressed in insect cells protects swine from Hog Cholera. *Journal of Virology* 67:9, 5435-5442.

Hitchcock, P., Brown, T. (1983). Morphological Heterogeneity among Salmonella Lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *Journal of Bacteriology* 154(1): 269-277.

kpl. Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. ELISA mate, 1994.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature, London* 227:680.

Magar, R. Minocha, H. & Lecomte, J. (1988) Bovine Viral Diarrhea virus proteins. Heterogeneity of cytopathogenic and noncytopathogenic strains and evidence of a 53K glycoprotein neutralization epitope. *Veterinary Microbiology* 16,, 303-314.

Mathaeus, W. (1979). Detection of three polypeptides in preparations of bovine viral diarrhea virus. *Archives of Virology* 59, 299-305.

Mathews, W. (1979). Detection of three polypeptides in preparations of Bovine Viral Diarrhea Virus. *Archives of Virology* 16, 303-314.

Mendoza, E.S., Correa, G.P., Hernández-Baumgarten, E., y Ciprián, C.A. (1992). Perspectiva de un Método de Diagnóstico Serológico rápido para Fiebre Porcina Clásica. I. XXI Congreso Nacional AMVEC 1992, Acapulco, Gro., México.

Mendoza, S., Aguilera, E., Colmenares, G., Hernández-B., E., Ciprián, A. (1994). Analysis of buoyant and ultraviolet of Hog Cholera strains. IPVS, Bangkok, Thailandia. pp. 85

Mendoza, S., González, S, Garibay, J., Hernández, B.E., Ciprián, A. (1994). Electron Microcopy study of different purified fractions of field, vaccine and reference strains of Hog Cholera. IPVS, Bangkok, Thailandia, pp.81

Mendoza, S., Correa, P., Ayala, G., Hernández, B. E., and Ciprián A. (1994). Biological differences among field, reference and vaccinal strains of Hog Cholera. IPVS, Bangkok, Thailandia, pp.82

Mendoza, S., Correa, P., Terpstra, C., Bloemraad, M., Hernández, B.E., and Ciprián A. (1994). Typing of Hog Cholera virus four field strains isolated in México using monoclonal antibodies. IPVS, Bangkok, Thailandia, pp.83

Mendoza, S., Correa, P., Terpstra, C., Bloemraad, M., Hernández, B.E., and Ciprián A. (1994). Typing of Hog Cholera virus from various countries by using monoclonal antibodies. IPVS, Bangkok, Thailandia, pp. 84

Moormann, R.J., Warmerdam, P.A.M. Van der Meer, B. & Hulst, M. (1990). Nucleotide sequence of Hog Cholera virus RNA: properties of the polyprotein encoded by the open reading frame spanning the viral genomic RNA. *Vet erinary Microbiology* 1994).

Muyldermans G., Caij, A., De Smet, A., Koenen, F. and Hamers R. (1993). Characterization of structural and non-structural proteins of Hog Cholera virus by means of monoclonal antibodies. *Arch Virol.* 131: 405-417.

Pritchett, R.F. and Y. C. Zee. (1975) Structural proteins of Bovine Viral Diarrhea Virus. *Am. J. Vet. Res.* 36:1731-1734.

Purchio, A.F., Larson, R. y Collet, M. (1984). Characterization of Bovine Viral Diarrhea virus proteins. *Jornal of Virology.* Vol. 50 (2) pp. 666-669.

Purchio, A.F., Larson, R. & Collet, M.S. (1984). Characterization of bovine viral diarrhea proteins. *Journal of Virology* 50, 666-669.

Pitchett, R., & Zee, Y. (1975). Structural proteins of Bovine Viral Diarrhea virus, *Am. J. Vet.* 36, 1731-1734.

Ramirez, N.R., Reynoso, G. M.L. **Fiebre Porcina Clásica.** Alsa Consultores, pp 1-111. 1993.

Rijn van P., van Gennip, H., de Meijer.J., & Moormann J. (1993). Epitope of envelope glycoprotein E1 of Hog Cholera virus strain Brescia. *Journal of General Virology,* 74 , 2053-2060.

Rümenapf, T., Meyers, G., Stark, R. & Thiel, H.(1989). Hog Cholera virus-characterization of specific antiserum and identification of cDNA clones. *Virology* 171, 18-27.

Rümenapf, T., Satrk, R., Meyers, G., Thiel, H. (1991). Structural proteins of Hog Cholera Virus Expressed by Vaccinia Virus: Further characterization and induction of protective immunity. *Journal of Virology* 65:2, 589-597.

Rumenapf , T., Meyers ,G., Stark ,R., Thiel, H. Hog Cholera Virus - Characterization of Specific Antiserum and Identification of cDNA Clones. *Virology* 171, 18- 27. (1989).

Rumenapf ,T., Stark , R., Meyers, G., Thiel, H. Structural Proteins of Hog Cholera Virus Expressed by Vaccinia Virus: Further Characterization and Induction of Protective Immunity. *Journal of Virology*, Feb. 1991,p. 589-597

Thiel, H., Stark, R., Weiland, E., Rumenapf, T., Meyers, G. Hog Cholera Virus: molecular. Composition of Virions from a Pestivirus. *Journal of Virology*, Sept. 1991,p. 4705-4712

Terpstra, C; Bloemradd, M. and Gielkens, A.L. 1984. The neutralizing peroxidase-linked assay for detection of monoclonal antibodies in epitopes on structural proteins of Hog Cholerae (Swine Fever) virus. Thesis. p. 41-50.

Towbin, H, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (19179). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of National Academy of Immunopathology* 16, 23-36.

Van Rijn, P.A. Van Gennip, P, Meijer E., Moormann. Epitope mapping of envelope glycoprotein E1 of Hog Cholerae virus strain Brescia. *Journal of General Virology* (1993), 74:2053-2060.

Wensvoort, C. Terpstra, E.P de Kluyver, C. Kragten, J.C. Warnaar. (1989). Characterization of pestivirus strains with monoclonal against Hog Cholera Virus.,in Epitopes on structural proteins of Hog Cholerae (Swine Fever) virus. Thesis. p. 41-50/

Wensvoort, G. Terpstra, C., Boonstra, J., Bloemraad, M. and Van Zaane, D. (1986). Production of monoclonal antibodies against Swine Fever virus and their use in laboratory diagnosis. *Veterinary Microbiology* 17, 129-140.

Wensvoort, G. (1989). Epitopes on structural proteins of Hog Cholera (Swine Fever) virus. Thesis doctor. Utrecht, March, 1989.

Weiland, Gi., Moening,v., Coulibaly, Z., Dahle, J., Leder, L. Liess, B (1990). Identification of conserved epitopes on a Hog Cholera virus protein. *Arch Virol.* 111: 213-225.

Weiland E., Stark R., Haas B., Rümenapf T., Meyers, G., Thiel H.J. (1990). Pestivirus Glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer. *J. Virol.* 64: 3563-3569.

Westaway E.G., Brinton MA., Gaidamovich S Y A, Horzinek MC, Igarashi A., Kääriäinen L, Lov D.K, Porteerfield JS, Russell P.K. Trent, DW (1985). Flaviviridae. *Intervirology* 24:125-139.

Wensvoort, G., Boonstra, J., Bodzinga, B. Immunoaffinity purification and characterization of the envelope protein E1 of Hog cholera virus. *Journal General Virology* (1990), 71:531-540.

Wensvoort, G., (1989). Topographical and functional mapping of epitopes on hog cholera virus with monoclonal antibodies against. *Journal of General Virology* 70, 2865-2876.

Wensvoort, G., Terpstra, C., Boonstra, J., Bloemraad, M., Van Zaane, D. (1986). Production of monoclonal antibodies. *Veterinary Microbiology* 12, 101-108.

Wensvoort, G., Bloemraad M., Tersptra, C. (1988). An enzyme immunoassay, employin monoclonal antibodies and detecting specific antibodies against classical Swine Fever virus. *Veterinary Microbiology* 17, 129-140.

Wensvoort, G. (1989). Epitopes on structural proteins of Hog Cholera (Swine Fever) virus, Thesis Doctoral. Lelystad, Holanda.

Wensvoort, G., Tersptra, C., Kluyver, E.P., Kragten, C. & Warnaar, J.C. (1989). Antigenic differentiation of pestivirus strains with monoclonal antibodies against hog cholera virus. *Veterinary Microbiology* 21, 9-20.

Wilke, G, Moening, V., Coulibaly, C., Dahle, J., Leder, L. and Liess, B. (1990). Identification of conserved epitopes on Hog Cholera virus protein. *Arch Virol* 111, 213-225, 1991.

Westaway, E.G., Brinton, M.A., Gaidamovich, S. YA., Horzinek, M.C., Igarashi, A. Kääriäinen, L. D.K., Portefield, J., Russel, P. & Trent, D. (1985b). Flaviviridae. *Intervirology* 23, 139-148.

Weiland, E., Ahl, R., Stark, R, Weiland F., Thiel, H (1992). A second envelope glycoprotein mediates neutralization of a Pestivirus, Hog Cholera Virus. *Journal of Virology* 60:6, 3677-3682.

8. CONCLUSIONES

- Las 17 "cepas" presentaron un buen título con la técnica de focos fluorescentes.
- Seis "cepas" fueron positivas al estudio realizado con anticuerpos monoclonales demostrando ser VFPC.
- La sacarosa, permitió realizar la ultracentrifugación por gradiente con buenos resultados
- El estudio de purificación por ultracentrifugación, permitió purificar 72 fracciones, 12 por cada cepa.
- De estas seis "cepas", las fracciones más importantes fueron la 8 y 9.
- El estudio de la densidad boyante nos permitió separar las "cepas".
- El estudio por espectroscopia ultravioleta, nos permitió encontrar picos correspondientes tanto a proteínas como para ácidos nucleicos.
- La microscopia electrónica de transmisión nos permitió localizar partículas virales en las fracciones seleccionadas.
- La PAGE-SDS mostró que en estas fracciones se encuentran las glicoproteínas reportadas E1 y E2, la proteína de cápside y la gp31.
- La PAGE-SDS mostró proteínas no reportadas que pueden utilizarse como marcadoras que pertenecen sólo de "cepas" de campo y otras de "cepas" vacunales.
- El estudio de inmunotransferencia permitió detectar enfrentando sueros de diferentes "*status*" inmunológico contra el patrón electroforético, mostrando importantes proteínas que sólo presentan proteínas de "cepas" de campo y proteínas de "cepas" vacunales.