



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CUAUTITLAN

2/
2er.

“ESTUDIO DE LA PERSISTENCIA DEL VIRUS DE LA FIEBRE
PORCINA CLASICA (VFPC) EN JAMONES PROCESADOS POR
EL METODO DE COCIDO”

PROYECTO DE INVESTIGACION

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A:

HEIDI JOHANNA AMEZCUA HEMPEL

ASESORES: DRA. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA
DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO

26636

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO DE MEXICO

1998



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

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



UNIDAD NACIONAL
AVENIDA LE
MEXICO

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

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



Departamento de

Exámenes Profesionales

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

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

El Proyecto de Investigación:

"Estudio de la Persistencia del Virus de la Fiebre Porcina
Clásica (VFPC) en Jamones Procesados por el Método de Cocido"

que presenta la pasante: Heidi Johanna Amezcua Hempel
con número de cuenta: 9256302-7 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Bióloga.

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

ATENTAMENTE.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 17 de junio de 199 8

PRESIDENTE M.en C. Clara Ines Alvarez Manriquez *Clara Ines Alvarez*

VOCAL Q.B.P. Judith Martínez Zamitiz *Judith Martínez*

SECRETARIO Dra. Susana E. Mendoza Elvira *Susana E. Mendoza Elvira*

PRIMER SUPLENTE Q.F.B. Marcela Hernández Vargas *Marcela Hernández Vargas*

SEGUNDO SUPLENTE M.en C. Ana Laura Vázquez Martínez *Ana Laura Vázquez Martínez*

AGRADECIMIENTOS.

A mis Padres (Enrique y Esther) y a mis Hermanos (Selva y Percival)
Por todo su apoyo, comprensión
Y Amor que me han brindado
Todo la vida.
Los Quiero Mucho.

A Edgar Sandoval por su comprensión,
Y apoyo incondicional para poder seguir
Adelante.

A mis amigas Hilda Córdova y Teresa Pichardo
Por su amistad y su compañía incondicional du-
rante toda la carrera.

A mi asesora la Dra. Susana Mendoza Elvira
Por la buena orientación que me otorgo y su
Ayuda incondicional.

A Laura Cano Y Ricardo Montes de Oca
Por su amistad y buenos deseos que han
Dado durante estos últimos meses.

ÍNDICE.

Resumen.	1
1 Introducción.	2
1.1 La Fiebre Porcina Clásica en México	2
1.2 Características de la familia Flaviviridae.	5
1.3 Transmisión.	6
1.4 Patogenia y Manifestaciones Clínicas	8
1.4.1 Infección aguda	8
1.4.2 Infección persistente	12
1.4.3 Infección congénita	14
2 Diagnóstico de Laboratorio	15
3 Profilaxis y Control.	17
4 Vacunas Utilizadas en la FPC	18
4.1 Primera generación (1908-1936).	18
4.2 Segunda generación (1936-1956).	18
4.3 Tercera generación (1960-1970)	19
4.4 Cuarta generación (1968-1970).	20
4.5 Quinta generación (1975-1992)	20
4.6 Sexta generación (1952-1992)	21
5 Objetivo general	21
5.1 Objetivos particulares	21
Justificación	22
6 Hipótesis.	23
Diagrama de Flujo.	23
7 Material y Métodos.	24
7.1 Protocolo del desafío anterior.	24
7.2 Jamones.	24
7.2.1 Preparación de la salmuera	24
7.2.2 Método de cocción	25
7.3 Nuevos grupos experimentales	26
7.3.1 Signos y Síntomas.	26
7.3.2 Sangrado.	26
7.3.3 Sacrificio y Toma de Muestras	26
7.3.4 Sangre.	27
7.3.5 Tonsilas.	27
7.3.6 Evaluación del estado de los órganos.	27
7.4 Inmunofluorescencia	27
7.5 Biometría Hemática.	31
7.5.1 Cuenta de Leucocitos.	31
7.5.2 Cuenta de Eritrocitos.	32
7.5.3 Determinación de Hemoglobina.	33
7.5.4 Determinación de Hematocrito.	34
7.5.5 Volumen Corpuscular medio.	34
7.5.6 Hemoglobina Corpuscular media.	35
7.5.7 Concentración Corpuscular media de Hb.	35
7.5.8 Cuenta diferencial	35
7.5.9 Cuenta de Plaquetas	36
Bibliografía	37

RESUMEN

La Fiebre Porcina Clásica (FPC) es una enfermedad infecciosa producida por un virus altamente transmisible de rápida diseminación; se transmite principalmente a través de secreciones y excreciones nasales, lagrimales, orina heces y mecánicamente, así como por moscos, pájaros, utensilios, desperdicios de alimento y comida. El virus de la fiebre porcina clásica (VFPC) puede presentarse con un curso sub-agudo, 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 VFPC es resistente en un medio ambiente rico en proteínas y puede sobrevivir en cerdos y sus subproductos a pesar de su procesamiento. En el siguiente protocolo de investigación propuesto se tratará de demostrar esto, mediante la obtención primeramente de piernas procesadas por el método de cocido, estas previamente infectadas con el VFPC, las cuales se les darán de comer a 4 grupos de cerdos constituidos de 4 cerdos cada uno, a estos se les realizará un seguimiento de 21 días, y se les tomarán muestras de sangre al comienzo del desafío, al quinto día, al décimo día, al decimoquinto día y al vigésimo día, posteriormente estos cerdos se sacrificarán y se observarán las lesiones y se tomarán muestras de los órganos blanco del virus, a las muestras de tejido se les realizará la prueba de inmunofluorescencia directa para detectar la presencia del virus, así como a las muestras de sangre se les procesará una biometría hemática para conocer si hubo alguna alteración en las cantidades de leucocitos eritrocitos y plaquetas principalmente.

1 INTRODUCCION.

La 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 moscos, pájaros, utensilios, desperdicios de alimento y comida (7).

El VFPC (sinonimias: *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(7).

1.1 LA FIEBRE PORCINA CLÁSICA EN MÉXICO.

La Fiebre Porcina Clásica (FPC) fue introducida al país en el año de 1877 a través de la importancia de pie de cría procedente de los Estados Unidos de Norteamérica(32).

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

A partir de 1973, se inició 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(32).

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 León, 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 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(32).

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 la necesidad 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 mayo de 1980, se aplicaron programas anuales de vacunación en varias etapas, declarándose libre 58 municipios del Norte de Sonora el 10 de enero de 1983(32).

A partir de esa 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 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 Zoonosológicas 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 más lógicas menos onerosas y más efectivas al participar en su planeación autoridades Estatales, Federales, Productores, Industriales, y Veterinarios especializados(32).

CASOS POSITIVOS DE FPC

AÑO 1997 (33).

ESTADO	MUNICIPIO	POBLACIÓN		ANIMAL
		TOTAL	ENFERMOS	MUERTOS
Edo. México	Texcoco	82	25	10
Chiapas	Cacahoatan	42	30	18
Veracruz	Tuxpan	3	2	0
Chiapas	Metapa de Dom.	6	6	1
Veracruz	Papantla	11	7	6
Morelos	Pte.de Ixtla	23	23	3
Edo. México	Teoloyucan	380	180	120
Edo México	Texcoco	13	13	1
D.F	Cuajimalpa	46	23	23
Edo. México	Teoloyucan	14	7	7
Veracruz	Puente Nacional	13	13	13
Edo. México	Texcoco	22	5	2
D F	Milpa Alta	6	3	3
Edo. México	Texcoco	10	1	0
Puebla	Acajete	3	3	3
Puebla	Cholula	10	4	6
Puebla	Acajete	4	4	3
Tabasco	Macuspana	3	3	1
Tabasco	Macuspana	5	2	2
Puebla	Cholula	2	2	2
México	Ecatepec	20	12	1
Total	24	718	368	225

1.2 CARACTERÍSTICAS DE VIRUS QUE PERTENECEN A LA FAMILIA FLAVIVIRIDAE.

Los virus que son patógenos para animales que están dentro de la familia Flaviviridae y que están dentro del género Flavivirus son el virus de la fiebre amarilla, virus de la encefalitis japonesa, virus Wesselsbron, virus louping ill, y el virus de la meningoencefalitis turkey Israe. Dentro del género Pestivirus se encuentran, el virus de la diarrea bovina, el virus del hog cholera (VFPC) y el virus de la enfermedad de las ovejas (30).

Son virus de 45 a 60 nm de diámetro y esféricos con una envoltura lipídica y peplómeros. Su densidad boyante es 1.20-1.23 g/cm³ en gradiente de sacarosa. El genoma consiste de una sola molécula lineal, de sentido positivo, RNA de cadena sencilla, y en tamaño 10.7 Kb (flavivirus), 12.5 Kb (pestivirus), o 9.5 Kb (virus de la hepatitis C) (30).

Los viriones contienen de 2 a 3 membranas con proteínas asociadas y la proteína core. Los viriones contienen lípidos que son derivados desde la membrana de la célula huésped. Los viriones contienen carbohidratos en la forma de glicolípidos y glicoproteínas. La replicación del RNA implica la síntesis de un RNA complementario, que sirve como plantilla para la síntesis de RNA genómico. Un solo marco de lectura abierto codifica la poliproteína que es proteolítica, corta hacia todas las proteínas virales. Las proteínas estructurales son codificadas en el extremo 5' final, las proteínas no estructurales incluyendo proteasas, helicasas, y polimerasas, en el extremo 3' final del RNA. La replicación se lleva a cabo en el citoplasma, y el ensamble implica un pasaje a través de él y es envuelto por la membrana interna de la célula (30).

La infección de las células de vertebrados originada por flavivirus es citolítica. Los flavivirus son transmitidos entre vertebrados por mosquitos y garrapatas los pestivirus sólo infectan a ciertos animales y son transmitidos por contacto directo e indirecto (por ejemplo,

alimento contaminado con heces, orina o secreciones nasales, etc.), todos los pestivirus son transmitidos transplacentariamente y congénitamente. El virus de la hepatitis C solo afecta a humanos y es transmitido por contacto sexual y transfusiones sanguíneas (30).

El VFPC es resistente a tratamientos físicos y químicos, es parcialmente dependiente del estado físico del material que contiene al virus. Por ejemplo el VFPC en fluidos de cultivos celulares es inactivado en 10 min. a 60 °C, mientras que la infectividad no es destruida en la sangre desfibrinada a una temperatura de 68 °C por 30 min. El VFPC es estable a un amplio rango de pH = 4 y cercano a 10, su inefectividad se ve debilitada. El VFPC se inactiva con solventes como el cloroformo y el éter, porque el virión contiene lípidos en su envoltura (1,3).

El virus puede infeccioso por meses en cerdos y subproductos de cerdos, un factor epizootológico importante. En el medio aparece el virus en un par de días, es inactivado por hidróxidos al 1% el cual es considerado como un buen desinfectante para las superficies contaminadas con el VFPC(1,3).

1.3 TRANSMISIÓN.

Bajo condiciones experimentales los cerdos han sido infectados por vía oral, nasal, aerogénica, conjuntival, genital y varias rutas parenterales. 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; también son excretadas importantes cantidades en fluido oral y pequeñas cantidades en la orina, heces y el fluido nasal y lagrimal. La excreción viral continúa hasta morir y en caso de sobrevivir se desarrollan anticuerpos específicos. Por otro lado la infección postnatal con “cepas” de baja virulencia, se caracterizan por períodos cortos de excreción y multiplicación viral seguida de una respuesta inmune. Como una consecuencia, las “cepas” virulentas del virus del VFPC

generalmente se distribuyen más rápido 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(2,15).

El VFPC puede sobrevivir en el cerdo o en sus subproductos. La supervivencia puede ser prolongada por meses y aún por años, cuando la carne es almacenada, congelada o refrigerada(18).

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(18).

La transmisión mecánica por el hombre es de gran importancia, significativa en áreas con una densa población de cerdos. Los granjeros, castradores y veterinarios pueden transmitir el virus por ropa, botas, instrumental y medicamentos contaminados, especialmente los de uso parenteral(17).

El VFPC puede ser transmitido naturalmente por el artrópodo hematófago que comúnmente está presente en las granjas, como el piojo (*Haematopinus suis*) y varias especies, moscas, (*Stomoxys tábanos* y mosquitos *Aedes*). La replicación de VFPC dentro de los artrópodos nunca ha sido demostrada. 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(17).

La principal forma de transmisión es por contacto directo, entre cerdos infectados y aquellos 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 (10).

Los cerdos susceptibles pueden contraer la enfermedad cuando la granja está contaminada o por desechos de alimentos contaminados, aun tratados con calor (9).

La alimentación del cerdo con desperdicios de alimento y basura de restaurantes, escamochas mal cocidas, pueden generar que el virus permanezca viable por un tiempo(10).

1.4 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, mucosa genital, o 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 la 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(27).

1.4.1 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(27).

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 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(27).

El órgano blanco secundario es el tejido que produce grandes cantidades de virus, dando como 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 (11).

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 cuál 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 cuál se distribuye el virus depende principalmente de la virulencia del virus, algunas "cepas" de alta virulencia pueden ser detectadas en la mayoría de los órganos a los 5-6 días del periodo de infección (11).

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%. Los severos trastornos de circulación parecen ser un factor determinante(11,30).

Al tercer día de la enfermedad la temperatura es de 40°C, luego sube a 41°C ó 42°C y después la temperatura llega a ser subnormal y durante estos períodos hay inactividad del animal y se presenta anorexia. Hay leucopenia, las cuentas de normales varían de 10 a 40000 glóbulos blancos por mm (entre el 4° y 7° día). Hay que tomar en cuenta que los cerdos sanos menores de 5 semanas, normalmente tienen una cuenta leucocitaria baja (14.273X10E3 leu/uL). Al principios de la enfermedad hay baja de glóbulos blancos. Pero pocos días después, cuando al animal le bajan las defensas del animal y presentan 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. El número normal de trombocitos varía de 200000 a 500000 y en la FPC baja a 50000 ó a 20000, es decir, al 10% (10).

Hay conjuntivitis, descarga nasal, disnea, constipación en algunos y diarrea en otros, vómito (sobre todo en la primera fase de la enfermedad). Varios días después de que sube la temperatura a 40°C ó 41°C, habrá hipotermia y la temperatura le baja a 37°C ó 38°C. Hay incoordinación del tren posterior, los animales caminan ladeados y arrastran las patas; 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. Puede haber también melena. Los casos crónicos pueden presentar áreas de decoloración en la piel de las orejas, alopecia y retraso de crecimiento (10).

Se presentan hemorragias en riñones, ganglios y en las serosas y congestión en la piel. En los ganglios linfáticos habrá edema, aumento de volumen, congestión, petequias y hemorragias. Las tonsilas presentan inflamación y después necrosis, ulceraciones y abscesos

causando 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 patognomónicos, se presenta principalmente en los bordes y a veces dentro del parénquima(10).

El estómago también puede estar vacío, porque el animal ha dejado de comer por varios días; hay congestión y hemorragias en la mucosa. 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, las cuales en la válvula ileocecal no son 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 (10).

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. Una decoloración y un color púrpura (cianosis) extendido a través del abdomen, morro y orejas, pueden también presentarse en los lados medios 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. 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 (9,10).

1.4.2 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(14).

En la FPC crónica se distinguen tres fases clínicas: La enfermedad aguda; el mejoramiento clínico y la exacerbación de la enfermedad aguda. La fase aguda es esencialmente 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. La desaparición 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 (18).

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 (18).

Los cerdos infectados persistentemente no producen anticuerpos neutralizantes 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 se desconocen. Cuando los cerdos sobreviven a un período largo de incubación mayor de 30 días, la infección puede ser meramente terminada (9). 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. Aquí la enfermedad es llamada "brote tardío", los cerdos infectados permanecen aparentemente sanos por un período largo, después del cuál desarrollan signos clínicos (14, 20). El síndrome posterior es usualmente asociado con infecciones congénitas. Algunas formas intermedias de FPC persistente pueden ocurrir (14).

La 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 más significativos. La FPC crónica puede ocasionar la presentación de cerdos redrojos, estos pueden tener cabeza grande y tronco pequeño (debido al severo retardo de crecimiento) y lesiones en la piel; estos redrojos frecuentemente se paran con la espalda arqueada y las piernas y el trasero posterior bajo el cuerpo (10).

En el estado terminal, los cerdos pueden estar anoréxicos, depresivos y febriles. Los cerdos con FPC crónica pueden sobrevivir por algunos meses, pero todos finalmente mueren(10).

1.4.3 Infección congénita.

Cuando una cerda preñada es susceptible al VFPC, los fetos se pueden infectar por la vía transplacentaria. El VFPC cruza la placenta, y puede consecuentemente 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, describen el hecho de que en la FPC aguda, la sangre periférica y linfocitos del bazo no responden consistentemente a mitógenos de las células T y B, mientras que los nódulos 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(5).

Los linfocitos de sangre periférica de los cerdos infectados persistentemente con VFPC tienen un decremento normal o ligero a los mitógenos (5).

La FPC es una enfermedad causada por desordenes de un sistema enzimático, principalmente de la producción de la quimi tripsina(16).

Una infección del VFPC congénita puede dar como resultado el aborto, momificación fetal, el producto muerto, o nacimientos de lechones débiles y con temblor, muertes neonatales, que nacen aparentemente sanos con una infección persistente y los cerdos normales con anticuerpos con la FPC. Pueden presentarse malformaciones de los órganos viscerales y del sistema nervioso central de los fetos. Muchos cerdos infectados “en útero” y que nacen vivos, mueren en un período corto, después de nacer, son comunes hemorragias de la piel en estos cerdos(1).

2 DIAGNOSTICO DE LABORATORIO.

En las últimas décadas en la investigación en el área de la virología, se han empleado las técnicas que utilizan anticuerpos acoplados a fluorocromos. Estas técnicas han sido superadas sólo hasta épocas recientes, con el advenimiento de las técnicas derivadas de la biotecnología. Sin embargo, las primeras aún son muy utilizadas y recomendadas en nuestro medio (21,22).

La variabilidad de los signos clínicos y las lesiones postmortem en los casos de FPC, raramente proveen una base para un diagnóstico inequívoco. Por esta razón, el diagnóstico tentativo de campo debe ser confirmado mediante pruebas específicas de laboratorio, para la detección del virus o de antígenos específicos(21,28).

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 tejido 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, o más horas postinoculación, y se observan si son positivas, utilizando un microscopio de fluorescencia(10,21,28).

La posibilidad de detectar la presencia de un agente infeccioso, en un periodo breve, mediante la técnica de la inmunofluorescencia, ha sido un factor importante para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas (21).

La técnica de inmunofluorescencia consiste en poner de manifiesto la presencia de antígenos, en tejidos de animales sospechosos o enfermos, y en cultivos de células infectadas por un virus; además de que también se puede poner de manifiesto la presencia de anticuerpos en los sueros de animales enfermos, o en los sanos que se han recuperado de la enfermedad y/o que han sido inmunizados previamente (21,24,25).

La reacción antígeno-anticuerpo que se obtiene, puede ser puesta en evidencia por la emisión de fluorescencia, si se cuenta con anticuerpos unidos a radicales orgánicos con propiedades fluorescentes (fluorocromos), y si se utiliza para tal efecto un microscopio de luz ultravioleta, para visualizarla. Por otra parte, se puede usar anticuerpos unidos a enzimas (inmunohistoquímica) como la peroxidasa, para realizar pruebas diagnósticas, si no se cuenta con un buen equipo de fluorescencia (21,24,25).

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 solo nos ayuda a corroborar los datos de la historia clínica. Una buena historia clínica explicará las irregularidades que se llegaran a observar en alguna prueba diagnóstica. Por ejemplo, si al hacer una prueba de laboratorio se obtiene un resultado positivo al VFPC 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 utilizado una prueba en 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 (10,21,28).

3 PROFILAXIS Y CONTROL.

Para lograr el control de la FPC en una región, la selección de una buena vacuna es determinante, porque de ello dependerá el éxito. O el fracaso, el tiempo que se tarde en llegar a la meta, la inversión económica y el esfuerzo requerido. Por su precio, y por su mejor antigenicidad, se prefieren las vacunas vivas suficientemente atenuadas. La "cepa" vacunal seleccionada no se debe diseminar de los cerdos vacunados a los susceptibles puestos en contacto con dichos vacunados(34).

La vacuna seleccionada, debe ser de comprobada inocuidad y antigenicidad, para los lechones; y se debe poder aplicar desde el primer día de edad, así como en los cerdos de todas las etapas; incluyendo las cerdas en celo y/o gestantes, en las cuales no debe producir problemas reproductivos; lo cual la acercaría a la vacuna ideal para ser utilizada en una Campaña tanto en granjas tecnificadas como en cerdos de estas características en las campañas, no se dejarían focos de animales susceptibles (sin vacunar).

La vacuna debe de contener altos títulos de virus vacunal, de modo que logre sobrepasar la inmunidad materna (colostral). Deberá ser preparada en cultivos de líneas celulares libres de contaminantes, especialmente los patógenos para el cerdo (34).

Mediante la vacunación se debe lograr detener los brotes ya iniciados de FPC, en aproximadamente 4 días después de la vacunación, ya no deben aparecer casos de FPC. Al ser utilizada permanentemente en una región, además de prevenir la presentación de brotes, debe evitar la circulación del virus de campo FPC. De modo que paulatinamente la presentación de brotes de FPC sea substituida, en las poblaciones de cerdos susceptibles, por pjaras resistentes y finalmente sin brotes de FPC; y sin circulación del virus vacunal, ni de virus de campo. La vacuna PAV-250 cumple satisfactoriamente con los principios antes

mencionados, y ha sido utilizada con éxito en México, en la Campaña de Erradicación de la FPC (34).

4 VACUNAS UTILIZADAS EN LA FPC.

4.1 Primera generación (1908-1936) (32).

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 con el virus esta con anticoagulante o de molienda de órganos (bazo) cosechado de animales previamente inoculados y en proceso de viremia febril. El suero "anticolera" era obtenido de la sangre de los cerdos hiperinmunizados con VLafPC. La sangre de estos animales se desfibrina 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 de 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 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.

4.2 Segunda generación (1936-1956) (32).

1.- Vacuna de Cristal Violeta.

Fue la primera vacuna desarrollada de virus inactivo. Se prepara a partir de sangre desfibrinada o bien de molienda de órganos (bazo y otros tejidos, retículo 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 Eucalipto, la cuál confiere inmunidad por aproximadamente 6 meses.

4.3 Tercera generación (1960-1970) (32).

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 varios manifiestan 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 derivadas del virus vacunal de las "cepas" de campo de baja virulencia del VFPC.

2.- Vacuna Heterotípica de Virus vivo de BVD.

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

4.4 Cuarta generación (1968-1970) (32).

1.- Swine Buffy Coat Cell Line.

Es una vacuna que incorpora la cepa "CJ" del virus vivo modificado de la FPC, por un 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 un área diferente del cerdo) con suero hiperinmune o anticuerpos contra la FPC, se desarrollan altos títulos que duran hasta los 204 días.

4.5 Quinta generación (1975-1992) (32).

1.- Vacunas Modernas de Virus Inactivado.

Estas vacunas se basan en separar el VFPC de los cultivos celulares infectados, por medio de un detergente (Triton x-100). El detergente desdobla 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 del VFPC confiere protección completa al cerdo.

4.6 Sexta generación (1952-1992), "cepas" de "alto pasaje" (32).

Vacunas derivadas de las siguientes "cepas":

- | | |
|-----------------|--------------------|
| 1.- Cepa CHINA. | 5.- Cepa MINESOTA. |
| 2.- Cepa GPE. | 6.- Cepa PAV-1. |
| 3.- Cepa CL. | 7.- Cepa PAR-147. |
| 4.- Cepa CR20. | 8.- Cepa PAV-250. |

5 OBJETIVO GENERAL.

Determinar si el método de cocido elimina al virus de FPC en jamones infectados con el mismo y evaluar si estos jamones son capaces de infectar a cerdos sanos.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES.

5.1.1 Comprobar la presencia del virus en los jamones infectados por el proceso de cocido.

5.1.2 Comprobar si los jamones infectados pueden causar una infección persistente en cerdos sanos alimentados con ellos, evaluando signos y síntomas.

5.1.3 Conocer y realizar la prueba de inmunofluorescencia para la identificación del VFPC en varias muestras de los animales infectados.

5.1.4 Realizar la prueba de bromearia hemática para evaluar si hubo alguna alteración en cuanto a los valores normales de eritrocitos y leucocitos en los animales infectados.

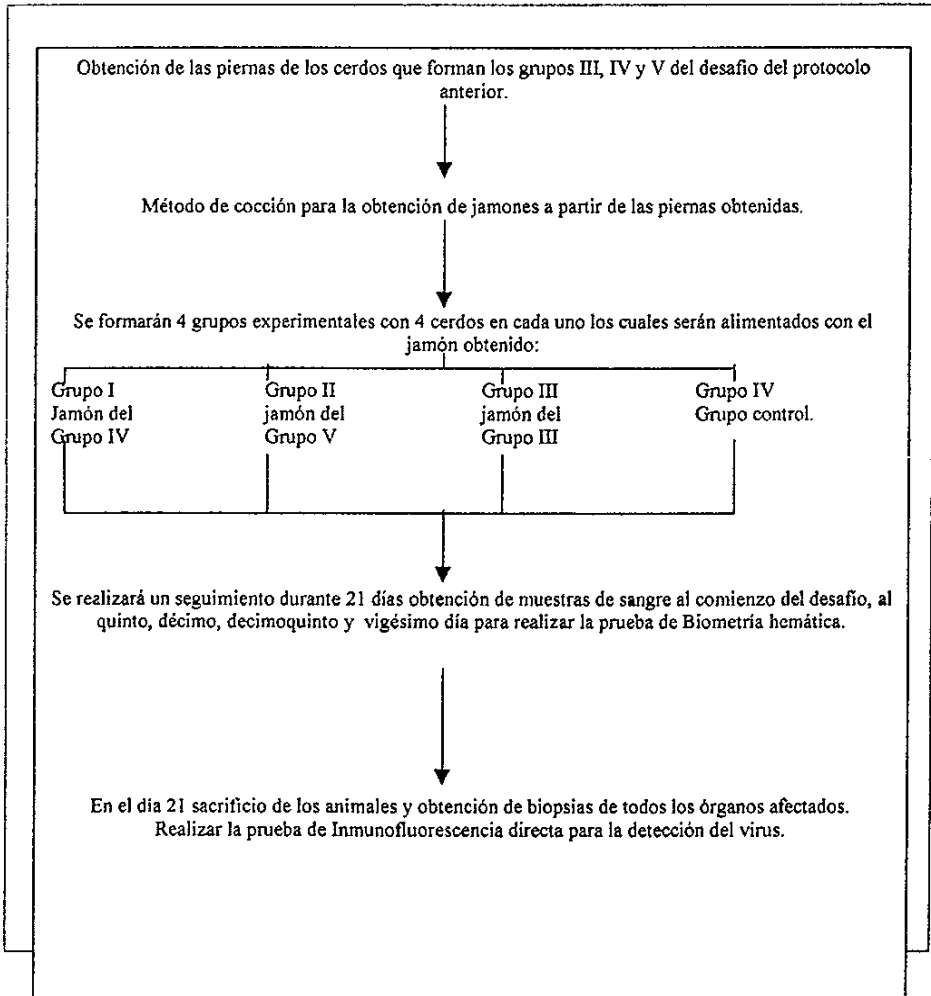
JUSTIFICACIÓN.

La FPC, es una enfermedad altamente contagiosa, que afecta al sistema nervioso, endotelios vasculares y células reticuloendoteliales. Se caracteriza por la persistencia de hemorragias generalizadas e infartos en los órganos internos. En el presente trabajo se tratará de demostrar la persistencia del VFPC en las piernas infectadas después del método de cocido para obtener los jamones, ya que 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 distancia y ser introducidos en países y áreas libres de esta enfermedad y así cerdos susceptibles pueden contraer la enfermedad. La alimentación del cerdo con desperdicios de alimento y basura de restaurantes, escamocha mal cocida, pueden generar que el virus permanezca viable, esto tiene un gran impacto en la economía de nuestro país, ya que en México hay muchos porcicultores, además de el cerdos se obtienen varios subproductos y si estos cerdos se infectan con el virus hay una diseminación en la producción y por lo tanto en el aprovechamiento del mismo.

6 HIPÓTESIS.

-Si el virus de FPC es resistente al método de cocción para preparar jamones entonces estos serán capaces de infectar a cerdos sanos.

DIAGRAMA DE FLUJO.



7 MATERIAL Y MÉTODOS.

7.1 PROTOCOLO DEL DESAFÍO ANTERIOR (31).

GRUPOS	VACUNACIÓN		PAV-250
	1ª DOSIS	2ª DOSIS	ALD
I	-	-	-
II	+	-	-
III	-	-	+
IV	+	-	+
V	+	+	+

Cada grupo consistió de 4 cerdos para el desafío y dos cerdos que se utilizaron como control.

De este protocolo se tomarán las piernas del grupo III, IV y V y se procesarán por el método de cocido para la obtención de jamones.

7.2 JAMONES.

7.2.1 Preparación de la salmuera (12).

La salmuera se preparará al 10% y contendrá los siguientes ingredientes 20g de NaCl, 0.24g de nitrito sódico, 0.24g de nitrato sódico, 6.0g de fosfato, grado alimenticio, 0.66g de ascorbato sódico, 3.6g de azúcar refinada, 0.18g de glutamato monosódico y 0.11 g de proteínas vegetales, hidrolizadas.

Se disolverá en primer término la sal, se utiliza agua suavizada y hervida. La sal se disolverá en una parte del agua caliente y luego se agregará agua hasta completar un volumen de 100 litros. Cuando la solución este fría, se medirá el grado salométrico y se adicionarán las sustancias curantes, una por una. Se agitará vigorosamente la solución hasta que los ingredientes se disuelvan. Si la salmuera se llegará a presentar opaca será necesario filtrarla para eliminar impurezas. Posteriormente, se refrigerará a 3°C.

7.2.2 Método de cocción (12).

1) Se seleccionarán las piezas de tamaño uniforme de acuerdo con las dimensiones de los moldes. Cada jamón se deshuesará y se eliminará el cuero. Luego se eliminará la grasa sobrenadante, dejando un grosor de 5 a 10 cm (12).

- Los jamones deberán estar fríos al momento del curado.
- 2) Se inyectará una cantidad de salmuera fría, igual al 10% de peso de cada jamón.
- 3) Los jamones se dejarán curar durante 4 días a 3°C sumergidos en salmuera. Se cambiarán de posición cada 24 horas mezclando bien la salmuera(12).
- 4) Se enfundará una cantidad de jamón correspondiente al tamaño del molde en una malla de algodón. Luego, se introducirá el jamón enfundado en el molde(12).
- 5) Se colocará la tapa al molde, ejerciendo una presión uniforme(12).
- 6) Se coserán los jamones a 70 u 80°C(12).
- 7) Terminado la cocción, cada molde se dejará escurrir y enfriar. Luego se volverá a prensar cada molde, porque durante la cocción el jamón y la presión de la tapa disminuyen. Los moldes se refrigerarán durante 24 horas(12).
- 8) Se sacará el jamón del molde y de la malla. Se lavará con agua tibia y se cortarán los bordes sobresalientes(12).
- 9) Los jamones se embutirán en fundas de plástico y se atará el extremo(12).

7.3 NUEVOS GRUPOS EXPERIMENTALES.

- Los grupos constaran de 4 cerdos de 45 días en cada grupo y se les dará de comer el jamón preparado de acuerdo con el siguiente cuadro:

GRUPO DE 4 CERDOS	PIERNAS DE CERDOS (1)PAV-250+ALD	PIERNAS DE CERDOS (2)PAV-250+ALD	PIERNAS DE CERDOS SOLO ALD
I	+	-	--
II	--	+	--
III	--	--	+
IV	--	--	--

(1) solo una dosis de PAV-250.

(2) dos dosis de PAV-250.

7.3.1 Signos y Síntomas.

- A los cerdos de cada grupo se les evaluara diariamente signos y síntomas, así, como la temperatura, esto se realizará durante un periodo de 7 a 21 días.

7.3.2 Sangrado.

- Se realizarán cinco sangrados los cuales se harán al comienzo del experimento (1er día), al 5to día, al décimo día, al decim.oquinto día y al vigésimo día.

7.3.3 Sacrificio y Toma de Muestras.

- Al término de 21 días de experimentación se llevará a cabo el sacrificio de los animales, así si estos mueren antes, se les realizará la toma de diferentes muestras como sangre y tonsilas.

7.3.4 Sangre.

- Se realizará la prueba de biometría hemática a la sangre obtenida el día del sacrificio, así como la obtenida durante toda la experimentación, esto se realizará para evaluar la cantidad de eritrocitos y leucocitos principalmente en los cerdos desafiados, para conocer si estos tuvieron alguna alteración de acuerdo a los niveles de referencia.

7.3.5 Tonsilas.

- A las tonsilas obtenidas de los animales de experimentación se le llevará a cabo la prueba de inmunofluorescencia para observar si presentan el VFPC.

7.3.6 Evaluación del Estado de los Órganos.

- Se llevará a cabo la observación de todos los órganos de los animales de experimentación para evaluar de manera visual y comparando con un órgano sano si hubo algún tipo de daño en ellos. También se les realizará inmunofluorescencia a bazo, riñón, hígado, timo, pulmón, ganglios linfáticos, que permita hacer una valoración de positividad a inmunofluorescencia en forma cualitativa ingestiva a estas muestras.

7.4 INMUNOFLUORESCENCIA.

Es una técnica directa de tinción con anticuerpos fluorescentes que se basa en la unión de los antígenos con los anticuerpos específicos. Se trata de una técnica rápida y sensible para identificar la presencia de una gran variedad de antígenos(21,24,25).

Técnica de inmunofluorescencia directa.- Este procedimiento fue desarrollado originalmente por Coons (Dinter, 1989); se aplica una solución de anticuerpos específicos, marcados con el fluorocromo, sobre la preparación que posee el antígeno (tejidos de animales enfermos, y/o cultivos celulares previamente infectados con el virus en estudio). Así, se forma un complejo antígeno-anticuerpo marcado con fluorescencia, que al ser observado al microscopio de luz ultravioleta, se ve fluorescente (21,25).

Este método utiliza pocos reactivos y se lleva a cabo en un solo paso y en pocos minutos. Tiene pocas posibilidades de dar reacciones inespecíficas, y por esta razón es una prueba que actualmente se usa muy ampliamente y con mucha frecuencia, para la identificación de antígenos(21,24,25).

Procedimiento de la Técnica Directa de Inmunofluorescencia.- En el caso de la FPC, los tejidos que deben ser examinados de rutina son: las tonsilas, ganglios linfáticos submaxilares y encéfalo, en este orden de importancia. También se pueden coleccionar otros tejidos, tales como bazo, riñón, pulmón, otros ganglios linfáticos y páncreas. Pero los más importantes son las tonsilas, los ganglios linfáticos y el encéfalo(21,25).

Al coleccionar los fragmentos de estos tejidos, cada uno de ellos deberá ser colocado en recipientes diferentes, previamente esterilizados y de tamaño pequeño; y se procederá a identificar perfectamente a cada uno de dichos recipientes(21,25).

Si los tejidos van a ser procesados dentro de las 4 horas siguientes, después del momento de la muerte o sacrificio del animal, estos tejidos podrán ser mantenidos en refrigeración a 4 C, durante ese tiempo; si van a ser procesados después de un período más largo, los tejidos deberán ser congelados a - 20 C, o preferiblemente a - 70 C(21,25).

a) Se recortarán los tejidos sospechosos de manera que queden en cubitos de aproximadamente 7 a 10 mm por lado, si es que el tamaño de la muestra del tejido coleccionado lo permite(21,25).

b) Se congelarán inmediatamente estos tejidos en el mismo crióstato para lo cual cada tejido será colocado en uno de los portaespecímenes del crióstato. Para adherir el tejido al portaespecímenes se puede utilizar el compuesto O.C.T. (440) Tissue-Tek, (se podrá utilizar también agua, pero se tiene el inconveniente de que se puede mellar fácilmente el filo de la

cuchilla). Estos materiales proporcionarán una matriz para adherir el tejido al portaespecímenes, para poder después cortarlos con el microtomo, en congelación(21,25).

c) Con el microtomo se realizarán cortes de 8 micras de espesor. Se procurará tener cortes completos y que no salgan con rugosidades. Para ellos los cortes se recogerán de la superficie de la cuchilla con un pincel, el cual deberá estar siempre dentro del crióstato, para que esté a la misma temperatura que tenga el crióstato, a - 20 C. Y los cortes se colocarán directamente sobre los portaobjetos. El portaobjeto deberá estar a temperatura ambiente, para que el corte del tejido, al ser colocado sobre ella se descongele instantáneamente y por lo tanto se adhiera a la laminilla(21,25).

d) Se harán 6 cortes a partir de cada tejido en estudio, y se montarán en el cubreobjetos.

Las preparaciones que contengan los cortes de los tejidos ya montados, se dejarán sumergidas en acetona fría, durante 20 minutos, para que se fijen(21,25).

e) Se sacarán de la acetona las laminillas conteniendo los cortes de los tejidos y se dejará que se evapore la acetona, lo cuál sucederá de inmediato(21,25).

f) Las secciones de tejidos que serán previamente fijadas, se inundarán con el conjugado (donado por NVSL-AMES IOWA) para el diagnóstico de FPC, y se incubarán inmediatamente durante 30 minutos, en una cámara húmeda, a 37°C. Se deberán cubrir con suficiente conjugado de modo que toda la sección del tejido quede cubierta. Si se llega a secar el conjugado sobre la preparación, será difícil de removerlo durante el lavado de la laminilla; y consecuentemente al observarla mediante el microscopio de luz ultravioleta, se podrá ver el tejido alrededor, parcial o totalmente, con un tono verde intenso, lo cual puede no permitir observar la fluorescencia específica de Fiebre Porcina Clásica(21,25).

g) Al terminar el período de incubación, se sacará cada laminilla de la cámara húmeda y se removerá el exceso de conjugado, o este se podrá absorber con una toalla de papel.

Inmediatamente después, se lavará cada una de las laminillas en un recipiente que contenga solución amortiguadora de fosfatos (PBS 1X) frío, para así retirar todo el conjugado sobrante que quedó sobre la preparación. Después se pasará la laminilla a otro recipiente que contenga PBS 1X limpio, dejándola ahí durante 10 minutos. Se puede mover suavemente para facilitar así la separación del conjugado excedente. Finalmente se lavarán las laminillas suavemente, en un recipiente que contenga agua destilada, para así remover las sales del PBS, las cuales si no son retiradas se van a secar sobre la superficie de la laminilla, y aparecerán en forma de cristales. Posteriormente se dejarán secar las laminillas(21,22).

h) Se depositarán sobre los cortes de tejidos ya secos, de 2 a 3 gotas de una mezcla de glicerina con PBS a partes iguales, y encima se colocará un cubreobjetos(21,22).

i) Al depositar la glicerina con el PBS, se evitará que se formen burbujas, porque éstas pueden interferir, estorbando, al momento de examinar las laminillas(21).

Testigos positivos y negativos.- En cada serie de laminillas teñidas es necesario utilizar tanto testigos negativos como testigos positivos; ya sea que se trate de un solo caso o de una serie de casos trabajados simultáneamente. Como testigos negativos, se utilizarán secciones procedentes de tejidos conocidos, que sean negativos al antígeno de FPC (de preferencia se utilizarán tejidos procedentes de cerdos SPF); y como testigos positivos se utilizarán tejidos que contengan antígeno de FPC, procedentes de cerdos SPC (previamente negativos a FPC), los cuales fueron inoculados con una cepa virulenta conocida de FPC, y después fueron sacrificados para coleccionar así las muestras testigos positivos o también se podrán utilizar células infectadas con el virus (21,23).

Interpretación.- La prueba será válida si las laminillas test negativas, resultan verdaderamente negativas y sin fluorescencia inespecífica; y si las laminillas positivas, resultan positivas. Los test positivos servirán para estar seguros de que tanto el

procedimiento de tinción, como el conjugado y el microscopio, están funcionando correctamente. Si no es así, la prueba no es válida(21,23).

En las laminillas que contendrán los cortes de tejidos problema, al ser observadas al microscopio de fluorescencia se podrán apreciar que en el citoplasma de las células infectadas se presentará un color verde brillante, específico. Estas células positivas pueden estar aisladas o en grupos. La fluorescencia específica correspondiente a FPC, se puede observar con mayor claridad en las células epiteliales que cubren internamente los infundíbulos de las amígdalas(21,23).

7.5 BIOMETRIA HEMÁTICA.

- La biometría hemática se llevará a cabo para saber si el animal en experimentación esta siendo afectado por el VFPC ya que esta prueba refleja la capacidad del organismo para reaccionar frente a la enfermedad, se tomará en cuenta principalmente la cuenta de leucocitos (28,29). La sangre se utilizará completa con anticoagulante.

7.5.1 Cuenta de Leucocitos.

Fundamento: Las muestras se diluyen en un líquido adecuado (Türk) y se cuentan en la celda de una cámara cuya capacidad se conoce (28,29).

Técnica: Se aspirará la sangre bien mezclada con una pipeta para glóbulos blancos hasta la marca 0.5. Se aspira el líquido de Türk con la misma pipeta hasta la marca 11 (debe rotarse la pipeta mientras se aspira el diluyente) y así se obtendrá una dilución. Agitará la pipeta 90 segundos, aproximadamente, para conseguir una suspensión uniforme. Se desechará tres o cuatro gotas del contenido de la pipeta, limpiando la punta de ésta con gasa o papel absorbente y se llenará la cámara para contar glóbulos en una forma tal que la introducción del líquido sea uniforme. Se esperará dos minutos y se contará con objetivo seco débil los cuadros grandes de las esquinas de la cuadrícula de la cámara de newbawer, el

resultado se multiplicará por 50 y así se obtendrá el número de leucocitos en un milímetro cúbico (29).

7.5.2 Cuenta de Eritrocitos.

Fundamento: Las muestras se diluyen en un líquido adecuado (Hayem) y se cuentan en la celda de una cámara cuya capacidad se conoce(28,29).

Técnica: Se aspira la sangre bien mezclada con una pipeta para glóbulos rojos hasta la marca 0.5. Después se aspirará el líquido de Hayem con la misma pipeta hasta la marca 101 (deberá rotarse la pipeta mientras se aspira el diluyente) y se obtendrá una dilución de 1:200. Se agitará la pipeta 2 a 3 minutos con un agitador mecánico, para conseguir una suspensión homogénea. Se desecharán cinco gotas del contenido de la pipeta, limpiando la punta de ésta con gasa o papel absorbente y se llenará la cámara de newbawer para contar glóbulos rojos en una forma que la introducción del líquido sea uniforme. Se esperarán 3 minutos para que las células se sedimenten; se deberá evitar la evaporación para no introducir un error grave. Con el objetivo de menos aumento (10X) cerca del foco central, se localizará el cuadro central de los 9 cuadros grandes. Se observa la distribución uniforme de las células. Con el objetivo de 45X se contarán todos los eritrocitos en 5 de los 25 cuadros pequeños del área central. Cada uno de los 5 cuadros pequeños que se van a contar, está limitado por líneas dobles o triples, y se divide en 16 cuadros más pequeños. Se contará un total de 80 cuadros pequeños. Se contarán las células empezando a la izquierda de la fila superior de los 4 cuadros pequeños, luego de derecha a izquierda en la siguiente fila y así sucesivamente.

El cálculo será; células contadas X 10 (0.1 mm de profundidad) X 5 (1/5 de mm cuadrado) X 200 (dilución de 1:200) = eritrocitos/microlítro, o bien la suma de las células en los 5 cuadros pequeños X 10000 = eritrocitos totales/microlítro (29)

7.5.3 Determinación de Hemoglobina (Hb).

Fundamento: La hemoglobina reacciona con el ferricianuro y forma metahemoglobina, la cual con el cianuro de potasio forma la cianometahemoglobina, las soluciones de este compuesto son relativamente estables, conservadas en el refrigerador, duran hasta tres días (28,29).

Técnica: En un tubo de 13 por 100 mm colocarán 5 mL de cianometa, después se agregará 0.20 mL de sangre perfectamente mezclada con la pipeta de Sahli, se mezclará por inversión y se esperarán 10 minutos. Se tomará la lectura en una celdilla de 12 por 75 mm a una longitud de onda de 540 nm. Se ajustará el 100% de transmitancia con solución de cianometa. Se convertirá el por ciento de transmitancia en gramos de hemoglobina en 100 mL de sangre con la tabla de calibración (29).

Tubo núm.	Solución de Hb en Diluyente de Drabkin mL 60 mg%.	Solución de cianometa (o Drabkin) mL.	Gramos de Hb en 100 ML, g. por ciento.
1	5	0.0	15.0
2	2.5	2.5	7.5
3	0.0	5.0	0.0

7.5.4 Determinación de Hematocrito (Ht).

Fundamento: Se basa en la separación de los glóbulos rojos y el plasma cuando se centrifuga la sangre a 2200 G durante 30 minutos, el paquete de eritrocitos en 100 mL es el resultado que se informa(28,29).

Técnica: Se llenará con sangre venosa o capilar las dos terceras partes de dos tubos heparinizados, cerrando el extremo más distante de la sangre con la flama y hacerle movimientos de rotación. Se centrifugará el tubo en una centrífuga especial cinco minutos a 12000 rpm(29).

La lectura se efectuará de la siguiente manera, colocando el tubo capilar en el surco del indicador de plástico, se cuidará de que el extremo inferior de la columna de glóbulos rojos coincida con la línea negra de dicho indicador. Se girará el disco inferior de manera que la línea de 100% quede debajo de la línea roja del indicador y sosteniendo en esta posición, por medio del orificio se girará el disco superior para que la línea espiral intercepte el tubo capilar en la interfase plasma-aire. Se girarán ambos discos juntos hasta que la línea espiral intercepte el tubo capilar en la interfase glóbulos rojos-glóbulos blancos. El micro hematocrito en mililitros por ciento se lee en el punto de la escala que queda debajo de la línea del indicador de plástico (28).

7.5.5 Volumen Corpuscular Medio.

Para conocer las dimensiones, en el espacio, de los eritrocitos, no basta la determinación del tamaño de los hematies por la medición microscópica de su diámetro, dada la morfología discoidea de estas células y las variaciones de unas a otras. Por ello se recurre actualmente, cuando se desean valores promediales más exactos, a la medición del "volumen corpuscular medio" (28,29).

El volumen corpuscular medio (VCM) se obtendrá de la siguiente manera:

$$\text{VCM} = \text{Hematocrito/Eritrocitos} \times 10$$

7.5.6 Hemoglobina Corpuscular Media.

La hemoglobina corpuscular media es la proporción real de hemoglobina que corresponde, por término medio, a cada hematíe, en cifras absolutas (29).

La hemoglobina corpuscular media (HCM) se obtendrá de la siguiente manera:

$$\text{HCM} = \text{Hemoglobina/Eritrocitos} \times 10$$

7.5.7 Concentración Corpuscular Media de Hb.

La concentración de hemoglobina por eritrocito en % es la llamada “concentración corpuscular media de hemoglobina” (MCHC)(29).

La concentración corpuscular media de hemoglobina (MCHC) se obtendrá de la siguiente manera:

$$\text{MCHC} = \text{Hemoglobina/Hematocrito} \times 10$$

7.5.8 Cuenta Diferencial.

La principal utilización de la cuenta diferencial es poder observar las diferentes formas de los glóbulos blancos (mononucleares y polionucleares) así como también si existen alteraciones en los eritrocitos(28,29).

Técnica: Se realizará una extensión de sangre bien mezclada, recientemente extraída o capilar, se dejará secar, se cubrirá con el colorante de Wright de minuto y medio a dos, se añadirá el doble de solución amortiguadora pH 6.4 y dejará actuar la mezcla seis minutos, se lavar a chorro de agua de la llave y se dejará secar la extensión. Se hará la observación con el objetivo de inmersión para hacer la diferenciación de las células y anotar las anomalías de cada uno de los elementos, en la serie blanca, de la serie roja y las plaquetas(28).

7.5.9 Cuenta de Plaquetas.

Fundamento: Se destruyen los eritrocitos con una solución de oxalato de amonio al 1% y se hace cuenta directa de plaquetas con el microscopio de contraste de fase en una cámara de newbawer de plano (29).

Técnica: Se cargará de sangre una pipeta para glóbulos rojos hasta la marca 0.5 y se llenará con líquido de dilución hasta la marca 101, se agitará, se cargará una cámara de newbawer plana, se dejará reposar 10 minutos en cámara húmeda, se contarán las plaquetas en toda la cuadrícula central con el microscopio de contraste de fase y a mayor aumento, la cifra obtenida se multiplicará por 2000 y nos da el número de plaquetas por milímetro cúbico (29).

VALORES SANGUINEOS NORMALES GANADO PORCINO(28).

Edad, Raza	Eritrocitos (1E6)	Hb (g/dl)	VPC (%)	Leucocitos (1E3)	Neutrófi. seg. (%)	Neutrófi. ban. (%)	Linfocitos (%)	Monocitos (%)	Eosinófilos (%)	Basófilos (%)
	7.44	12	32-47	15	41		47	8	2.5	0.1
21-25 d	5.1	12.1		10.193	31.7	7.9	47.7	8	1.4	1.4
32-36 d	7	12.7		14.273	31.5	11.5	49.6	5.7	0.8	0.8
3 meses	6.6	11.1		18.265	25.2	8.9	54.8	2.7	7.3	0.5
5 meses	5.1			12.871	22.2	8.3	58.7	8.9	1.7	0.6
	5.9	9-16.8	32-47	8.6-20	39		52	3	4.5	1
					(30-50)		(40-60)	(1-10)	(1-10)	(0-4)
Al nacer	5.722	12.36		12.7	68.41		29.64	1.26	0.45	0.23
Adultos				19.866	32		66.4		1.6	
	6.7	12-13.2		8.2	39		52.1	3.3	4.5	1.2
	6.5	13	42	16	37	1.0	53	5	3.5	0.5
	(5.8)	(10-16)	(32-50)	(11-22)	(28-47)	(0-4)	(39-52)	(2-10)	(0-11)	(0-2)
Al nacer	5.02	10.93	32.65	8.43						
Adultos	7.93	15	46.3	7.2						

BIBLIOGRAFÍA.

- 1) Torrey, J.P and Prather, J K , 1963. Heat inactivation of hog cholera virus. Y. Studies with defibrinated blood and serum. Proc. Ann Meeting U.S. Livestock. San. Assoc , 67:414-418.
- 2) Mengeling. W.L. and Drake, L., 1969. Replication of hog cholera virus in cell culture, Am. J. Vet. Res., 30.1817-1823.
- 3) Kubin, G., 1967 in vitro Merkmale des Schweine pestvirus. Zentralbl Veterinaermed. Beih., 14:542-543.
- 4) Aynaud J.M., 1968. Etude de la multiplication in vitro d'un clone du virus de la peste porcine. Rech Vet , 1:25-36.
- 5) Van Oirshot, J.T , 1980. Persisten and inapparent infections with swine fever virus of low virulence their effects on the immune. Thesis, State University of Utrecht, 1980.
- 6) Pirtle, E.C. and Mengeling, W.L., 1971. Antigenic diferences in two hog cholera strains. Am J. Vet. Res., 1473-1477.
- 7) 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. Reach. Vet , 5.373-393.
- 8) Kamijyo, Y., Ohkhuma, S., Shimizu, M. And Shimizu, Y., 1977 Diferences in pathogenecity and antigenecity among hog cholera virus strains. Nat. Inst. Anim. Health Q , 17:133-140.
- 9) Dunne, H. W., 1975. Hog cholera In: H. W. Dunne and A. D. Lenan (Eds.), Diseases of Swine, 4th de. Iowa State University Press, Ame, I.A. pp 189-255.
- 10) Correa-Girón, p. 1981. Cólera porcina. In: Enfermedades Virales de los animales domésticos (monogástricos), Vol. I. 4ª edición. Editada por Correa-Girón. Coordinación y producción. Arte e impresos B.J., pp 7-28.
- 11) Ressang, A.A , 1973. a Studies on the pathogenesis of hog cholera. I. Demonstration of hog cholera virus subsequent to oral exposure. Zen tralbl. Veterinaermed. Beih., 20: 265-271.

- 12) Dott. Prof. Gaetano Pal, Trinieri. 1983. *Elaboración de Productos Cárnicos*, Ed. Trillas, México.
- 13) Brown Barbara 1976 *Técnica de Laboratorio en Hematología*, Elicien, Barcelona España, pp 67-95.
- 14) 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 semvar on Hog Cholera/Classical Swine Fever and African Swine Fever, Hannover, EUR 5904, pp 214-230
- 15) 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.
- 16) Liess, B., Frey. H.R., Prager, D., Hafez, S.M. and Roeder, B., 1976 The course of natural swine and investigations on the development of inapparent SF Infections In: CEC seminar on Diagnosis and Epizootology of Classical Swine Fever, Amsterdam, EUR 5486, pp 99-113.
- 17) 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.
- 18) Mengeling, W.L. and Parker, R.A., 1969, Pathogenesis of Chronic hog Cholera host response, *Am. J. Vet Res*; 30.409-417.
- 19) Terpstra, C., B loemrad, M and Gielkens, A.L.J., 1984. The neutralizing peroxidase-linked assay for detection of antibody agains swine fever virus *Vet. Microbiol*; 9:113-120.
- 20) Van Oirschot, J.T. and Terpstra, C., 1977 A congenital persistent swine fever infections. I. Clinical and virological observations. *Vet. Microbiol*; 2:121-132.
- 21) Giron, C.P; 1993. *Diagnostico de Fiebre Porcina Clásica (FPC) por la técnica directa de inmunofluorescencia.* , Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, México, pp 8-12.
- 22) Dinter, 1989. Immunofluorescence (IF) test. In: *Diagnostic Virology. A review of methods at the National Veterinary Institute*, Edited by: J. Moreno-Lopez Swedish University of Agricultural Sciences, National Veterinary Institute. Uppsala, Sweden, Swedish International Developing Authority, pp 20.
- 23) Ramírez H; Valero G y Fraire M; 1993. *Diagnóstico Serológico de Enfermedades Virales*. En: Valero, G (Editor): *Diagnóstico Veterinario. Requisitos, proceso, interpretación, ventajas y desventajas de técnicas diagnósticas*. 1era edición, SARH, CENID-Microbiología-INIFAP, PAIEPEME, SMPV, pp 120.
- 24) Margani, R.A, 1982. *Inmunología e Inmunoquímica*, Ed. Médica Panamericana, 3era edición, Argentina, pp 260-261, 434-435.

- 25) Morilla, A, 1986. Manual de Inmunología, Ed. Diana, 1era edición, México, pp 97-125.
- 26) Mohanty S, Dutt S; 1983. Virología Veterinaria, Ed. Interamericana, México, pp 216-218.
- 27) Hilton, S; 1980. Patología Veterinaria, Ed. Hispanoamericana, México, pp 316-321.
- 28) Maxine, B; 1990. Manual de Patología Clínica en veterinaria. Ed. Limusa, México, pp 33-97.
- 29) Balcells, A; 1981. La Clínica y el Laboratorio, Ed. Marín, España, pp 145, 149-150, 152, 154-155, 165.
- 30) Fields, 1996. Virology, Edit by B.N Fields, 3era edicion, Philadelphia, pp 31.
- 31) Mendoza, S, 1997. Memorias del XXXII Congreso Nacional AMVEC, México , pp 79.
- 32) Ramirez, N.R; (1993), Fiebre Porcina Clásica, Alsa Consultores, S.C.
- 33) Cabrera, A; (1997), CONASA.
- 34) Girón, P, (1996), Experiencias en México sobre el uso de Biológicos para el Control y Erradicación de la Fiebre Porcina Clásica, IX Jornada Científica y V Encuentro de Ganaderos "DR. Oscar O. Martinez", pp 42.