

1-01674



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

Transmisión por vía respiratoria del virus de
la fiebre porcina clásica y su prevención por
medio de la vacunación con la cepa PAV-250.

T E S I S

Que para obtener el Título de:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL

P R E S E N T A

MVZ CARLOS GONZALEZ SILVA

COMITE TUTORAL:

DRA. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA

DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO

M.A. PABLO CORREA GIRON

DR. JUAN A. MONTAÑO HIROSE

DR. PEDRO PRADAL ROA

MEXICO, D. F.

FEBRERO 2000



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.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco cumplida y sinceramente a las siguientes personas que contribuyeron para llevar a un fin exitoso esta investigación:

Doctora Susana Mendoza E.
Doctor Abel Ciprián C.
M.A. Pablo Correa G.
Doctor Francisco Gurría T.
ING Fernando Sotres
MVZ Antonio Guerrero
M en C Horacio Lara P.
MVZ Martha Macías G.
MVZ Raúl Ramírez L.
E en PA Victor Toledo N.
E en PV Alberto Orduña .

Asimismo expreso mi gratitud a mi esposa C.D. Maria del Socorro Noguez Corona - y a mis hijos Carlos Ollintzin y Cuauhtli Alonso por su cariño, comprensión y apoyo para concluir esta empresa.

Indice

Capítulo		Página
	Agradecimientos	4
1.	Resumen en español	5
2.	Resumen en inglés Summary	7
3	Introducción	8
4	Hipótesis	
5	Objetivos	12
6	Material y Métodos	13
7	Cuadro 1. Distribución de los grupos y sus tratamientos	15
8	Cepas virales	18
9	Pruebas de laboratorio	18
10	Evaluación de la transmisión del VFPC por medio de aerosoles	20
11	Diseño y construcción de las cámaras de aislamiento	20
12	Análisis estadístico	24
13	Resultados	25
14	Experimento 1	25
15	Experimento 2	42

16	Discusión	56
17	Experimento 1	56
18	Experimento 2	64
19	Conclusiones y recomendaciones	71
20	Literatura consultada	72

Transmisión por vía respiratoria del virus de la fiebre porcina clásica y su prevención por medio de la vacunación con la cepa PAV-250.

RESUMEN

Este experimento constó de dos partes. En cada una de ellas, dos grupos de 4 lechones de aproximadamente 12 kilogramos de peso, seleccionados al azar fueron colocados por separado, en el interior de dos cámaras de aislamiento con ventilación unidireccional que estaban conectadas entre sí por un ducto de un metro de largo, de manera que en cada una de las cámaras había cuatro lechones. Los 16 lechones estaban sanos y fueron seronegativos a anticuerpos contra los virus de la FPC, enfermedad de Aujeszky y síndrome disgenésico y respiratorio del cerdo (PRRS, por sus siglas en inglés) demostrado por pruebas de inmunoperoxidasa (FPC y EA) y ELISA.

En el primer experimento, cuatro lechones fueron inoculados por vía intramuscular con el VFPC, cepa ALD con un título de $10^{4.3}$ DLC₅₀. A las 86 horas p.i., cuando se detectó fiebre de 41°C en promedio, los lechones fueron introducidos a una de las cámaras de aislamiento; previamente otros cuatro lechones fueron introducidos en la cámara ubicada en el lado opuesto con el fin de que inhalaran el aire contaminado exhalado por los lechones inoculados. Los cuatro lechones que inhalaban el aire contaminado, desarrollaron distintos síndromes clínicos: un lechón mostró severos signos clínicos típicos de FPC y murió en forma natural 14 días después de inhalar el aire contaminado. Tres cerdos desarrollaron FPC con los siguientes signos: retardo del crecimiento, diarrea, prolapso rectal y severa rinitis necrosante; dos de ellos murieron a los 21 días postinhalación en forma natural; y al cuarto cerdo se le aplicó la eutanasia debido al severo deterioro de su condición corporal, a los 28 días postinhalación. En estos cuatro lechones se detectó seroconversión a los 12 días postinhalación y resultaron positivos al aislamiento del VFPC, así como a la prueba de IF en las tonsilas.

En el experimento II, cuatro lechones fueron vacunados con la cepa PAV-250 del VFPC y a los 14 días postvacunación cuando los lechones ya tenían anticuerpos neutralizantes contra el VFPC, fueron desafiados con la cepa ALD del VFPC y fueron introducidos a una de las cámaras. a las 86 horas post

desafío; previamente, en la cámara del lado opuesto, se habían introducido cuatro lechones susceptibles, para que inhalaran el aire presumiblemente contaminado procedente de los lechones vacunados y desafiados. A partir de los líquidos residuales de los lechones vacunados y desafiados, se aisló VFPC con título $10^{1.2}$ TCID₅₀. Sin embargo, los cerdos que inhalaron el aire contaminado producido por los lechones vacunados y desafiados, no desarrollaron FPC, no seroconvirtieron ni se aisló el VFPC a partir de tejido linfoide, aunque se observó leve fluorescencia en los cortes de tonsila de los 4 lechones. Por otra parte, en los estudios histológicos de los órganos linfoides de estos mismos, se observó leve a moderada atrofia.

Estos experimentos se llevaron a cabo dentro de las instalaciones del Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal (CENASA), de la Dirección General de Salud Animal (DGSA), Comisión Nacional de Sanidad Agropecuaria (CONASAG), Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural (SAGAR) ubicadas en Tecámac, Estado de México.

Airborne transmission of the hog cholera virus and its prevention by means of vaccination with the PAV-250 strain.

Summary

Objectives To document the airborne transmission of the HCV in susceptible pigs and the effect of vaccination with the PAV-250 HCV strain on the airborne transmission of HCV.

Animals For experiment one: eight pigs 45 days old and about 12 to 15 kg were purchased at a free HCV farm. For experiment two, eight pigs from the same farm, age and weight.

Procedure Before the experiment, all of the pigs didn't have seric antibodies against HCV, Aujeszky's disease or PRRS by the immunoperoxidase test (HCV and AD) and ELISA.

In experiment 1, four pigs were inoculated with the ALD HCV strain ($10^{4.3}$ LDTC) by the intramuscular route . When they developed fever, they were introduced to the chamber during 86 hours and then euthanatized. In experiment2 the pigs were vaccinated with the PAV-250 strain of HCV and at 14 days postvaccination were challenged with the HCV ALD strain, afterwards the pigs were exposed to the air presumably contaminated with aerosols, placing them at the other side of the duct between the chambers and remained there for 86 hours. They were euthanatized 29 days later.

Results In experiment 1, the pigs exposed to contaminated air with aerosols, died as the result of infection with the HCV at days 14, 21 and 28 postinhalation. These four pigs seroconverted from the twelfth day postinhalation and the HCV was isolated from them and the fluorescent antibodies test performed in their tonsils was positive . In experiment 2, the exposed pigs to contaminated air didn't seroconvert nor the HCV was isolated from the lymphoid tissue. However, it was observed mild fluorescence in tonsils section from the four pigs.

Conclusions The HCV was transmitted by air at a distance of 1m when the pigs were completely susceptible to the microorganism. Vaccination with the PAV-250 HCV strain, avoids the airborne transmission of the HCV from challenged to susceptible pigs when they are at 1 m distance. It was documented, under these experimental conditions, the airborne transmission of HCV so as its prevention by means of vaccination with the PAV-250 HCV strain. These experiments were performed at Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal, located in Tecamac, México.

1. INTRODUCCION.

Los sistemas de producción porcina que se han utilizado desde fines de la década de los 70's, se caracterizan por la crianza de cerdos bajo las más altas condiciones de salud.¹ La tendencia anterior se debe a que las enfermedades más comunes del cerdo, conllevan un costo económico considerable; así como también a que la intensificación de la producción porcina no se ha hecho acompañar de mejoras sensibles en la salud de los cerdos.²

Entre los sistemas que han sido desarrollados con el fin de alcanzar los objetivos mencionados en el párrafo anterior están el sistema de "todo dentro - todo fuera", recomendado por los daneses para explotaciones de engorda de 100 o más cerdos¹ y el destete precoz medicado. Sin embargo, las explotaciones que siguen estos sistemas deben enfrentarse a la adquisición de reemplazos, que pueden ser potenciales introductores de enfermedades a la granja.

Los sistemas de producción que aplican el destete precoz medicado y/o la producción en dos o tres sitios, han mostrado eficacia en el mantenimiento de altos niveles de salud². En estos sistemas, los lechones son separados de las cerdas y de los cerdos de engorda y los parideros son construidos alejados de los corrales de engorda.

Uno de los problemas, es determinar que tan separados deben estar los sitios de producción para garantizar que no habrá transmisión de enfermedades entre los diferentes sitios, a través de aerosoles infectantes

1.1 Virus de la fiebre porcina clásica.

La fiebre porcina clásica (FPC) es una enfermedad de los cerdos, causada por un virus de la familia Flaviviridae, del género Pestivirus. Otros miembros de este género, son el virus de la diarrea viral bovina y el de la enfermedad de la frontera.

El virus de la FPC (VFPC) es envuelto y su genoma está constituido por ARN de cadena sencilla. El virión cuenta con cuatro proteínas, de las cuales tres, E1, E2 y E3 (del inglés E= "envelope") son glicosidadas y la cuarta que se denomina C (por cápside), no es glicosilada^{15,17}.

Es un virus esférico, de 40 a 70 nm de diámetro, con una envoltura estrechamente adherida a la nucleocápside, la cual es icosaédrica, de 25 a 35 nm de diámetro. La superficie externa también presenta forma icosaédrica, por lo que se supone que las glicoproteínas penetran todo el espesor de la envoltura viral y se insertan en las proteínas de la nucleocápside ^{8,9,10,11,12}.

En condiciones naturales al infectar a los cerdos, el virus ingresa por la vía oronasal; se replica inicialmente en las células epiteliales de las criptas de las tonsilas; después el virus invade el tejido linfoide y macrófagos, los cuales lo transportan a los nódulos linfáticos regionales. En ese sitio se multiplica y se origina una virémia inicial. Posteriormente el virus se reproduce en grandes cantidades en el bazo, placas de Peyer, médula ósea y en los endotelios vasculares de todo el cuerpo ^{12,13}.

Se ha postulado que la transmisión del virus de la FPC de los cerdos infectados a los susceptibles, se lleva a cabo principalmente por contacto y mediante la ingestión de agua o alimentos contaminados con sangre, secreciones y excreciones: nasales, lagrimales, orina, heces, provenientes de cerdos clínicamente enfermos o por cerdos portadores de FPC; así como mecánicamente por moscas, pájaros o utensilios; por el consumo de escamocha infectante que contenga carne cruda o inadecuadamente procesada, o por productos cárnicos derivados de cerdos infectados; existen vectores como los cuervos, larvas de *Trichinella*, y moscas mordedoras ^{8,12,14}.

La transmisión del virus de la FPC por medio del aire de piara a piara, parece ser poco significativa ¹⁰. Sin embargo en la década de los 20's, investigadores de la Estación Experimental de Indiana, EUA, reportaron que en un local cerrado, una pantalla hecha de tela gruesa de algodón, protegió a los cerdos de un lado de la misma de cerdos infectados con FPC que estaban del otro lado ²⁰. Otros autores demostraron que el VFPC pudo transmitirse a través de aerosoles controlados conteniendo partículas de 1 a 2 micrómetros de diámetro cuando son dispersados mediante explosión de una pelota de hule inflada con aire en un local cerrado, donde después de 15 a 30 minutos de la explosión se introdujeron dos cerdos. Los lechones estaban cubiertos, de manera que sólo su región oronasal fue expuesta directamente al aire y ambos cerdos desarrollaron FPC; estos autores concluyeron que esa podría ser la forma en que el virus se disemina en la naturaleza ^{21,22}. Asimismo en forma accidental, otros autores, demostraron la transmisión del VFPC liofilizado a través del aire de un sistema de calefacción central, en unidades de aislamiento. En un estudio efectuado para establecer las propiedades de aerosol del VFPC liofilizado, se menciona que las partículas virales

incorporadas en polvo u otro medio de transmisión aérea, de tamaño mucho mayor que el virus, todavía estarían dentro del rango de aerosol ²¹. Asimismo se han hecho ensayos de desafío con aerosoles de cerdos vacunados contra FPC, para probar la eficacia de su vacunación ²³. Se está de acuerdo en que las partículas deben ser de tamaño de 10 micrómetros o menos para que puedan ser dispersadas por el aire. El rango de colonización de las corrientes de aire por parte de las partículas es directamente proporcional a su tamaño. En condiciones de campo, el virus seco incorporado en el polvo, la paja o fibras vegetales podría ser aerotransportado bajo ciertas condiciones climáticas y por lo tanto, diseminar la enfermedad hacia áreas aisladas ²¹.

Terpstra, logró transmitir VFPC entre cerdos donadores y cerdos recipientes alojados en cubículos de aislamiento. Los cubículos estaban conectados por un tubo de 700 cm por 7.5 cm de diámetro, mantenidos a una presión ligeramente distinta entre los dos, lo que resultaba en un flujo de aire de: 4.5 m³ / h (.075 m³ /min), por lo que concluyó que la transmisión aerógena del VFPC es concebible entre unidades ventiladas mecánicamente y de localización cercana ¹⁴.

Debido a la necesidad de actualizar la información disponible en este campo, se planeó este estudio para demostrar la posibilidad de transmisión del virus de la FPC por medio del aire con aerosoles contaminados bajo las condiciones de este experimento, así como para verificar el efecto de la vacunación con la cepa PAV-250 en la transmisión del VFPC por la vía respiratoria.

1.2 Vías de transmisión

La transmisión de enfermedades en forma horizontal es muy común, y ocurre principalmente a través del contacto nariz-nariz o heces-nariz. Otra forma de transmisión de enfermedades es a través de vías indirectas como pueden ser vectores, aerosoles o fuentes de agua contaminada. La posibilidad de infección por vías indirectas está influida a su vez por la cantidad de polvo, el microbismo ambiental, los aerosoles y la ventilación ^{11,12,13}.

A este respecto, se recomiendan 2 pies cúbicos de aire por minuto, por cerdo para mantener una ventilación adecuada en las zahurdas.

Con relación a los gases presentes en el aire, a continuación se mencionan brevemente las concentraciones de algunos, los cuales pueden estar presentes en el aire inspirado por los cerdos así como la forma en que influye la concentración de los mismos en la homeostasis:

- Bióxido de carbono (CO₂). El cerdo puede soportar hasta 20 000 ppm sin efectos negativos.
- Amoníaco (NH₃). Niveles de 35 ppm no afectan al cerdo, pero más de 100 ppm causan anorexia y cambios citológicos en aparato respiratorio.
- Ácido sulfhídrico (H₂S). A partir de 20 ppm produce anorexia e irritación en ojos y nariz.
- Metano (CH₄). Niveles de 100 ppm pueden ser peligrosos por su explosividad³.

Se ha informado de la transmisión por aerosoles, de los virus de la peste porcina africana y del síndrome disgenésico y respiratorio porcino (PRRS, por sus siglas en inglés), en distancias cortas, así como del Actinobacillus pleuropneumoniae^{4,5}.

Se ha sugerido con base en datos epidemiológicos que el virus de la enfermedad de Aujeszky y el Mycoplasma hyopneumoniae pueden transmitirse por medio de aerosoles^{5,6,7}. La sobrevivencia de estos patógenos varía dependiendo de las condiciones de temperatura y humedad. Sin embargo, otros factores como la densidad, estado inmune del hato y las características del microorganismo pueden determinar la diseminación y la propagación microbiana⁵.

Se han descrito varios métodos para preparar aerosoles para ser suministrados a los cerdos, con fines de inmunización experimental. En uno de ellos¹⁶, se vacunaron los cerdos contra Mycoplasma hyopneumoniae utilizando un nebulizador médico ultrasónico, ajustado para producir partículas de aerosoles de 0.5 a 5 micras de diámetro. El aire que penetró, fue filtrado biológicamente. Se usaron cámaras de nebulización desechables⁵.

En otro estudio, para determinar la transmisión del virus del PRRS y de A. pleuropneumoniae vía aerosoles, los cerdos fueron alojados en cámaras de aluminio y cubiertas por Plexiglas, conectadas por un ducto rectangular de 0.6 X 0.6 m y de un metro de largo. El aire antes de ser introducido a las cámaras, fue calentado y humidificado (27 °C y 60-80% de humedad). La ventilación se controló con un termostato, y varió de 0.08 a 0.20 m³/min/cerdo. La velocidad del aire introducido a la cámara donde estaban alojados los cerdos inoculados, varió entre 1.6 y 3.2 m³/s. El aire que salió de la cámara donde estuvieron los cerdos susceptibles, fue filtrado⁵.

La transmisión de microorganismos a través del aire aunque parece obvia , es difícil de probar, especialmente cuando hay grandes distancias de por medio.

2. Hipótesis

El VFPC excretado por cerdos inoculados infecta animales susceptibles por medio de aerosoles arrastrados por una corriente de aire, desde una cámara a la otra. La vacunación con la cepa PAV 250 previene esta transmisión .

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

El objetivo general de este estudio es demostrar el VFPC al ser exhalado y excretado por los cerdos inoculados, puede infectar a cerdos susceptibles, a través del aire, así como documentar el efecto de la vacunación de cerdos con la cepa PAV 250 sobre la transmisión de virus de campo de la FPC por vía aérea.

3.2 Objetivos particulares

3.2.1- Comprobar el estado sanitario de los lechones que serán utilizados en los experimentos, mediante pruebas de inmunoperoxidasa para corroborar la ausencia de anticuerpos contra los virus de la FPC, Paramixovirus porcino y enfermedad de Aujeszky; y con la prueba de ELISA para detectar anticuerpos contra el virus de PRRS.

3.2.2 - Diseñar y construir cámaras de aislamiento con ventilación forzada unidireccional, para la exposición de los cerdos a los aerosoles.

3.2.3. Determinar si dentro de las condiciones de este experimento se infectan los cerdos susceptibles a través del aire contaminado procedente de los cerdos previamente inoculados por la vía intramuscular (I.M.), con virus virulento de la FPC.

3.2.4. Determinar si la vacunación de cerdos con la cepa PAV-250 contra la FPC, previene la infección por la vía aérea.

La transmisión de microorganismos a través del aire aunque parece obvia , es difícil de probar, especialmente cuando hay grandes distancias de por medio.

2. Hipótesis

El VFPC excretado por cerdos inoculados infecta animales susceptibles por medio de aerosoles arrastrados por una corriente de aire, desde una cámara a la otra. La vacunación con la cepa PAV 250 previene esta transmisión .

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

El objetivo general de este estudio es demostrar el VFPC al ser exhalado y excretado por los cerdos inoculados, puede infectar a cerdos susceptibles, a través del aire, así como documentar el efecto de la vacunación de cerdos con la cepa PAV 250 sobre la transmisión de virus de campo de la FPC por vía aérea.

3.2 Objetivos particulares

3.2.1- Comprobar el estado sanitario de los lechones que serán utilizados en los experimentos, mediante pruebas de inmunoperoxidasa para corroborar la ausencia de anticuerpos contra los virus de la FPC, Paramixovirus porcino y enfermedad de Aujeszky; y con la prueba de ELISA para detectar anticuerpos contra el virus de PRRS.

3.2.2 - Diseñar y construir cámaras de aislamiento con ventilación forzada unidireccional, para la exposición de los cerdos a los aerosoles.

3.2.3. Determinar si dentro de las condiciones de este experimento se infectan los cerdos susceptibles a través del aire contaminado procedente de los cerdos previamente inoculados por la vía intramuscular (I.M.), con virus virulento de la FPC.

3.2.4. Determinar si la vacunación de cerdos con la cepa PAV-250 contra la FPC, previene la infección por la vía aérea.

3.2.5. Evaluar la naturaleza y severidad de las lesiones macro y microscópicas en los cerdos inoculados vía I.M. con el VFPC y en los cerdos que inhalaron el aire contaminado con las exhalaciones procedentes de los cerdos inoculados con el VFPC.

3.2.6 Titular el virus de la FPC inoculado en los cerdos de los grupos “A” y el recuperado de los cerdos del grupo “B”.

3.2.7. Titular el VFPC aislado de las muestras del líquido residual, (mezcla de heces, orina, agua y alimento), que se acumule debajo del piso de ambas cámaras).

4. Material y métodos

4.1 Diseño experimental

Se utilizaron cuatro grupos de cuatro cerdos, de 45 días de edad, y con un peso aproximado de 12-15 kg. Los cerdos fueron adquiridos en una granja libre de FPC.

Se permitió la adaptación de los lechones durante dos días antes de iniciar el experimento.

Dos días después del arribo de los cerdos, se obtuvo una muestra de suero de cada uno para confirmar la ausencia de anticuerpos contra los virus de la FPC, enfermedad de Aujeszky, Paramixovirus porcino y síndrome disgenésico y respiratorio del cerdo.

3.2.5. Evaluar la naturaleza y severidad de las lesiones macro y microscópicas en los cerdos inoculados vía I.M. con el VFPC y en los cerdos que inhalaron el aire contaminado con las exhalaciones procedentes de los cerdos inoculados con el VFPC.

3.2.6 Titular el virus de la FPC inoculado en los cerdos de los grupos “A” y el recuperado de los cerdos del grupo “B”.

3.2.7. Titular el VFPC aislado de las muestras del líquido residual, (mezcla de heces, orina, agua y alimento), que se acumule debajo del piso de ambas cámaras).

4. Material y métodos

4.1 Diseño experimental

Se utilizaron cuatro grupos de cuatro cerdos, de 45 días de edad, y con un peso aproximado de 12-15 kg. Los cerdos fueron adquiridos en una granja libre de FPC.

Se permitió la adaptación de los lechones durante dos días antes de iniciar el experimento.

Dos días después del arribo de los cerdos, se obtuvo una muestra de suero de cada uno para confirmar la ausencia de anticuerpos contra los virus de la FPC, enfermedad de Aujeszky, Paramixovirus porcino y síndrome disgenésico y respiratorio del cerdo.

Grupos experimentales.

4.2 Experimento 1.

Transmisión del VFPC a cerdos susceptibles por el aire contaminado con aerosoles.

4.2.1. Grupo 1 "A": Cerdos inoculados con la cepa ALD del VFPC .

Cuatro cerdos seronegativos a VFPC fueron seleccionados al azar y marcados con los aretes: 9,10,11 y 12.

Se les inoculó por la vía IM con 1 ml de la cepa ALD del VFPC, con un título de $10^{4.3}$ DLC₅₀. Durante 80 horas se permitió la incubación de la enfermedad, fuera de la cámara, en un corral separado de la unidades de aislamiento del CENASA, DGSA, CONASAG, SAGAR.

Con el fin de establecer con exactitud el momento en que estos cerdos presentarían fiebre de más de 41 °C., y por lo tanto, estarían excretando VFPC⁹, se registró su temperatura rectal, en la mañana y en la tarde. Estos cerdos fueron alojados dentro de la cámara "a", cuando tenían bien declarado el estado febril, es decir a las 80 horas después de haber sido inoculados.

Este grupo de lechones permaneció en el interior de la cámara "a", durante las siguientes 86 horas. Al término de este tiempo, los lechones fueron trasladados a la sala de necropsias, donde se procedió a :

- coleccionar muestras de sangre para separar el suero
- sacrificarlos por eutanasia
- efectuar estudios postmortem
- coleccionar muestras de diferentes tejidos para analizarlos por las pruebas de inmunofluorescencia directa, intentar el aislamiento viral y para llevar a cabo la histopatología.

Se registró la temperatura y la humedad ambiente en el interior de las cámaras.

Cuadro 1. Diseño experimental. Distribución de los grupos y sus tratamientos.

Grupos / cámara	Vacunados PAV-250	Desafiados	Receptores de los aerosoles
1A	0/4	4 / 4 $10^{4.3}$ DLC ₅₀	
1B	0/4		AEROSOL A 0.85 m ³ / MIN./ CERDO; VELOCIDAD DEL AIRE 2 m / s
2A	4/4	4 / 4 $10^{4.3}$ DLC ₅₀	
2B	0/4		AEROSOL A 0.85 m ³ / MIN./ CERDO; VELOCIDAD DEL AIRE 2 m / s

Los grupos identificados con la letra A, fueron alojados en la cámara "a" y ambos fueron desafiados. Los grupos identificados con la letra B, fueron introducidos en la cámara "b", y fueron los receptores de los aerosoles presuntamente infectados.

4.2.2. Grupo 1 "B". Cerdos susceptibles expuestos al aire procedente de los lechones previamente inoculados.

Cuatro cerdos susceptibles seronegativos al VFPC, (aretas: 13,14,15 y 16), seleccionados al azar, fueron alojados en la cámara "b", aproximadamente 10 minutos antes de que los lechones inoculados (grupo 1 "A"), fueran introducidos en la cámara "a".

Ambos grupos de lechones (1 "A" y 1 "B"), permanecieron en el interior de las cámaras, durante las siguientes 86 horas.

Durante ese lapso, se creó un flujo de aire en sentido de la cámara "a" hacia la cámara "b" (Figura 1), con el fin de favorecer que el aire de los cerdos inoculados se trasladara hacia la cámara "b".

Después de ese tiempo, el grupo 1 "B" se mantuvo en observación en una corraleta independiente hasta que los cerdos murieron.

Durante ese lapso se estuvo registrando diariamente su temperatura rectal y se colectaron muestras de sangre desfibrinada para intentar el aislamiento del VFPC, y de suero para buscar anticuerpos contra el VFPC.

Se registraron los signos clínicos que presentaron los lechones y la temperatura y humedad ambiental existente en el interior de las cámaras.

4.3 Experimento 2.

Efecto de la vacunación de cerdos con la cepa PAV-250 sobre la transmisión del VFPC por aire contaminado con aerosoles.

4.3.1 Grupo 2 "A".

Cerdos vacunados con la cepa PAV-250 de la vacuna contra la FPC.

Cuatro cerdos susceptibles seronegativos al VFPC (aretas: 2,4,6 y 8), seleccionados al azar, fueron vacunados con 2 ml de la cepa PAV 250 por la vía IM.

El día 14 post-vacunación fueron trasladados a una corraleta independiente, donde fueron desafiados por la misma vía, con 1 ml de la cepa ALD del VFPC con un título de $10^{4.3}$ DLC₅₀.

Durante 80 horas se permitió la incubación de la enfermedad manteniendo los cerdos en la corraleta aislada. Se registró su temperatura rectal y posteriormente fueron alojados en la cámara "a" durante 86 horas. En ese lapso, se creó un flujo de aire en el sentido de la cámara "a" hacia la Cámara "b" (figura 1), con el fin de favorecer la circulación del aire contaminado en

forma natural hacia la cámara "b", donde estaban alojados los cuatro cerdos susceptibles del grupo 2 "b".

Al término de las 86 horas, los lechones fueron trasladados a la sala de necropsias, donde se procedió a:

- colectar muestras de sangre para separar el suero
- sacrificarlos por eutanasia
- efectuar estudios postmortem
- colectar muestras de diferentes tejidos para analizarlos por las pruebas de inmunofluorescencia directa, intentar el aislamiento viral y para llevar a cabo la histopatología.

Se registró la temperatura y la humedad ambiental en el interior de las cámaras.

Asimismo, se colectaron muestras del líquido residual (mezcla de heces, orina, agua y alimento), que se acumuló debajo del piso de esta cámara durante la estancia de los lechones en su interior, con el fin de intentar el aislamiento del VFPC.

4.3.2 Grupo 2 "B". Cerdos susceptibles expuestos al aire procedente de los cerdos previamente vacunados y desafiados.

Cuatro cerdos susceptibles seleccionados al azar, seronegativos al VFPC identificados con aretes: 1, 3, 5 y 7, fueron alojados en la cámara "b", aproximadamente 10 minutos antes de que los lechones inoculados (grupo 2 "A"), fueran introducidos en la cámara "a".

Ambos grupos de lechones (2 "A" y 2 "B") permanecieron en el interior de sus respectivas cámaras, simultáneamente durante 86 horas

Después de ese tiempo, el grupo 2 "B" fue trasladado a una corraleta independiente, donde se mantuvo en observación durante 30 días.

Durante ese lapso se estuvo registrando diariamente la temperatura rectal de los cerdos. Se colectaron muestras de sangre desfibrinada para intentar el aislamiento del VFPC y de suero para buscar anticuerpos contra el VFPC.

Se registraron los signos clínicos que presentaron los lechones.

Asimismo, se colectaron muestras del líquido residual que se acumuló debajo del piso de esta cámara durante la estancia de los lechones en su interior, con el fin de intentar el aislamiento del VFPC .

Se registró la temperatura y la humedad ambiental del interior de la cámara.

4.4 Cepas virales

4.4.1. Ceba ALD del VFPC.

Para infectar a los cerdos de los grupos 1 "A" y 2 "A", se utilizó la cepa patógena ALD del VFPC, con un título de $10^{4.3}$ DLC₅₀ .

ALD es una cepa de campo de VFPC, procedente del Japón³⁷ , que fue donada al Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal (CENASA) de la CONASAG - SAGAR , por el National Institute of Animal Health de Tsukuba Japón en 1981, en el marco del Acuerdo de Cooperación Internacional México-Japón, Proyecto "Técnicas Zoonosológicas No. 39", a través de la Agencia Internacional de Cooperación del Japón (JICA).

4.4.2. Vacuna contra la FPC cepa PAV-250

Para la vacunación se empleó la cepa PAV-250 del VFPC.

Es una vacuna producida por PRONABIVE que contiene VFPC, atenuado mediante 250 pases en la línea celular de riñón de cerdo PK15⁴⁶.

Esta vacuna se aplicó siguiendo las recomendaciones del fabricante, es decir, a una dosis de 2 ml por vía IM, a cada uno de los lechones del grupo 2 "A".

4.5. Pruebas de laboratorio.

4.5.1. Inmunofluorescencia directa.

Esta prueba se realizó con muestras de tonsilas y de nódulos linfoides, para buscar el antígeno del VFPC en los cerdos de los cuatro grupos, con un conjugado elaborado en el CENASA con anticuerpos policlonales^{28,29}.

4.5.2 Aislamiento de virus

Se intentó el aislamiento del VFPC a partir de las muestras de:

- 1) Sangre desfibrinada, la cual fue obtenida mediante punción del golfo de las yugulares de los cerdos de los cuatro grupos en general y específicamente :
 - a) Del grupo 1 "B" cuando los cerdos presentaron fiebre
 - b) Del grupo 2 "B" a los 21 días post-exposición a los aerosoles contaminados.
- 2) A partir de muestras de tejidos linfoides.
- 3) De los líquidos residuales colectados del piso de las cámaras "a" y "b" procedentes de los cerdos del experimento 2 en el cual los cerdos del grupo 2 "A" fueron vacunados con PAV 250 y que después fueron desafiados y cuyas exhalaciones fueron conducidas hacia el grupo 2 "B".

La sangre o el fluido de las muestras de los tejidos linfoides fue inoculada en microplacas con monoestratos de cultivos primarios de células de testículo de cerdo, mantenidos en un medio con 5% de suero fetal bovino, libre de anticuerpos contra el VFPC y contra el virus de la diarrea viral bovina. Los cultivos celulares inoculados con las muestras fueron revisados a las 48 y 72 horas postinoculación. Posteriormente se aplicó a las microplacas la prueba de inmunoperoxidasa para evidenciar la presencia del VFPC.

Se tituló el VFPC en la sangre de los cerdos de los grupos 1" B" y 2 "B" por el método de Reed and Muench¹⁷.

4.5.3 Inmunoperoxidasa

Esta prueba se utilizó para determinar anticuerpos contra los virus de la FPC, Paramixovirus porcino y enfermedad de Aujeszky²⁸.

4.5.4. Inmunoensayo enzimático (ELISA).

Esta prueba se aplicó para detectar anticuerpos contra el virus del síndrome disgénico y respiratorio del cerdo.

4.5.5. Histopatología

Se colectaron muestras de tonsilas, nódulos linfáticos, bazo, pulmón, estómago, intestino, riñón, hígado y encéfalo, las cuales fueron fijadas en formol amortiguado al 10%, y embebidas en parafina. Posteriormente se hicieron cortes de 4 a 5 micras de espesor y se colorearon con hematoxilina-eosina.

4.5.6. Hematología.

Se colectaron muestras de sangre con anticoagulante para efectuar hemogramas:

Experimento 1. Se colectaron muestras tres días antes y 4 días después de la inoculación de los cerdos del grupo 1 "A", así como antes y después de exponer los cerdos del grupo 1 "B" a los aerosoles exhalados por los cerdos del primer grupo.

Experimento 2. Se colectaron muestras del grupo de cerdos vacunados y desafiados (2"A"), tres días antes de la vacunación y 7 días después del desafío y del grupo expuesto a los aerosoles (2"B"), tres días antes de exponerlos y 28 días después de haber sido expuestos

4.6. Evaluación de la transmisión por medio del aire del VFPC.

La transmisión a través del aire del VFPC, fue evaluada indirectamente por medio de las observaciones efectuadas en los cerdos expuestos a los aerosoles, tales como signos clínicos, pruebas serológicas, aislamiento viral y lesiones a la necropsia.

4.7. Diseño y construcción de las cámaras de aislamiento con ventilación forzada unidireccional.

4.7.1. Materiales utilizados para construir las cámaras.

Se utilizaron 12 hojas de Triplay de madera de 12 mm de espesor, 1.22 m x 1.22 m x 1.22 m, las cuales fueron unidas con tornillos para madera de 25 mm de largo. Tanto el exterior como el interior de las cámaras; fueron pintados con pintura vinílica de color blanco. El piso de las cámaras fue cubierto con pintura de esmalte color negro y un sellador para proteger a la

madera contra la humedad. Asimismo, se colocó “piso porcícola”, de plástico corrugado, a una altura de 5 cm sobre el nivel del piso de madera (Figura 1).

En el interior de la cámara se instaló un bebedero de chupón y un comedero tipo tolva, de lámina galvanizada.

La pared de la cámara “a”, localizada en el extremo opuesto al conducto para el paso del aire, fue perforada con 36 agujeros de 3 a 5 mm de diámetro para permitir la entrada de aire del exterior hacia el interior de las cámaras .

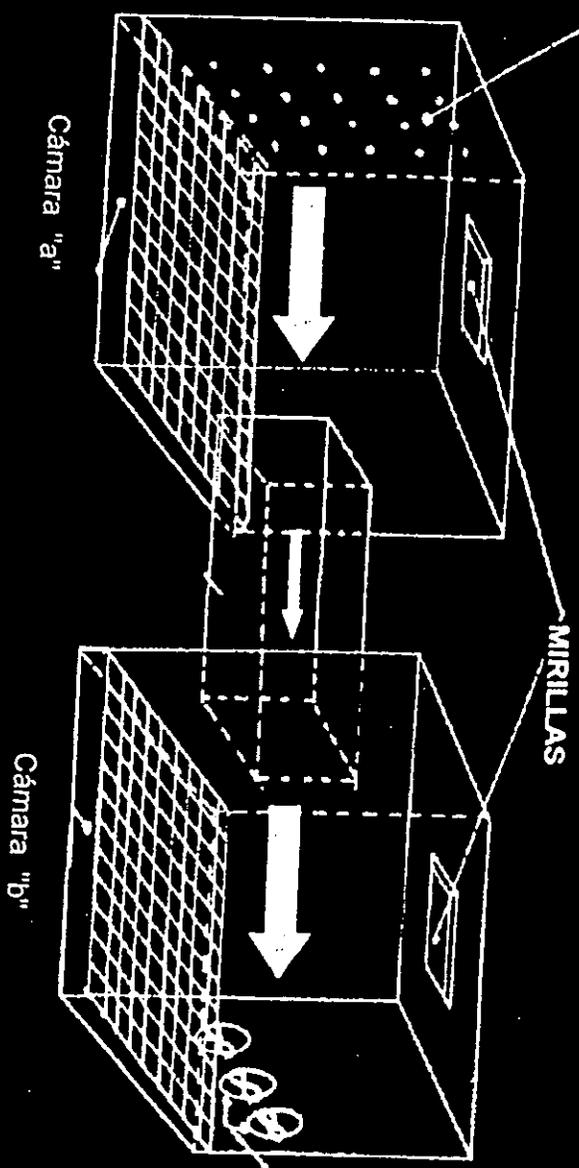
En la pared de la cámara “b” localizada en el extremo opuesto al ducto de comunicación, se instalaron tres ventiladores eléctricos, de 11 cm de diámetro, a una distancia de 15 cm del piso con el fin de forzar el paso del aire de la cámara “a” hacia la “b” .

En el techo de cada una de las cámaras se instaló una lámina de acrílico color café, de forma rectangular, sellada, de 50x40 cm por lado y una lámpara para la iluminación interior.

Las dos cámaras estuvieron comunicadas por un conducto, de madera de triplay de 12 mm de espesor, de forma rectangular de un metro de largo, 40 cm de altura y 40 cm de ancho. En ambos extremos de este conducto se instalaron tres travesaños de madera de 3x3 cm y 50 cm de largo , con el fin de impedir el paso de los lechones de la cámara “a” hacia la “b” y viceversa. Tanto el exterior como el interior del conducto fueron pintados con pintura vinílica de color blanco.

Este conducto permitió que el aire fluyera de la cámara que alojaba a los lechones inoculados (cámara “a”), hacia la segunda, donde estaban los lechones expuestos a los aerosoles (cámara “b”).

**PERFORACIONES PARA
EL INGRESO DE AIRE**



Cámara "a"

Cámara "b"

MIRILLAS

VENTILADORES

Figura 1. Diseño de las cámaras. Las flechas indican el sentido del flujo de aire

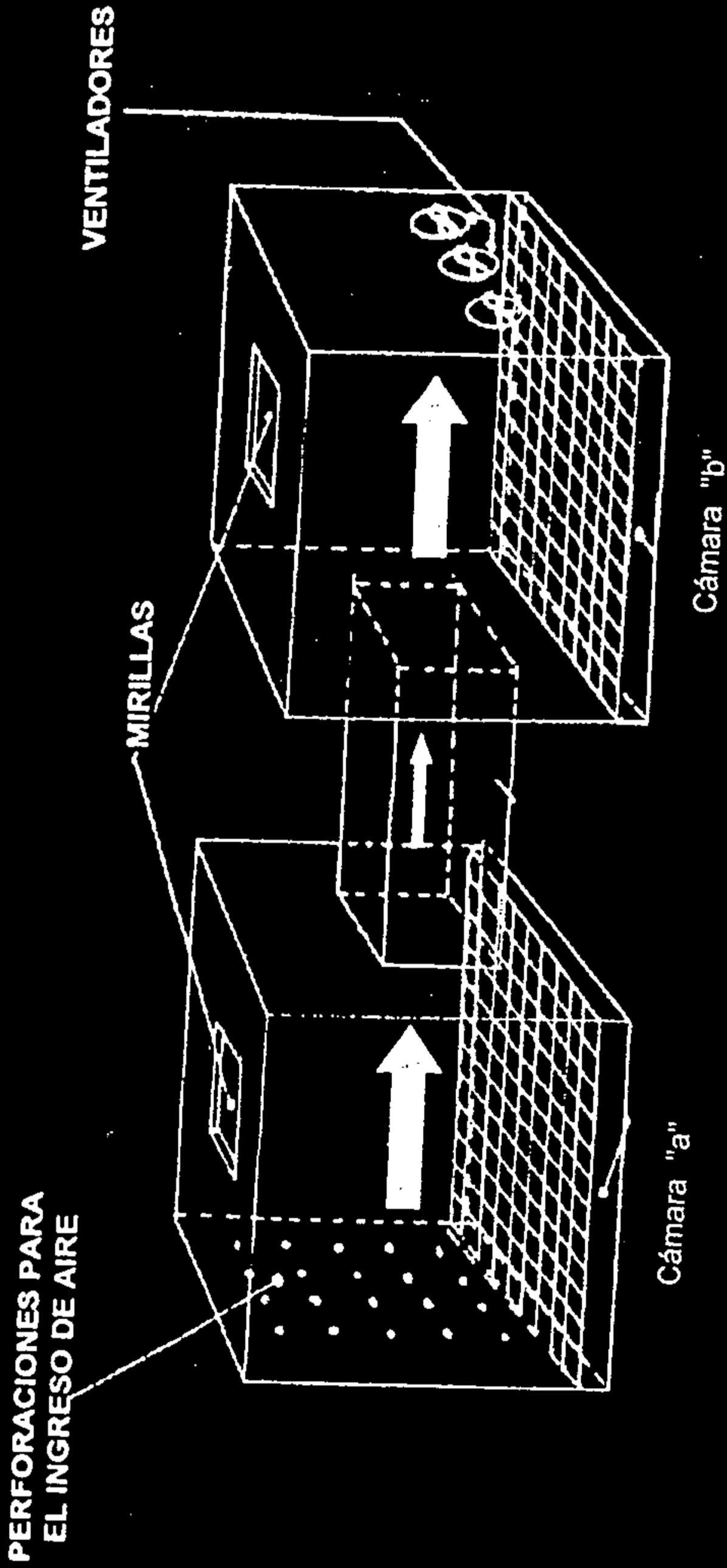
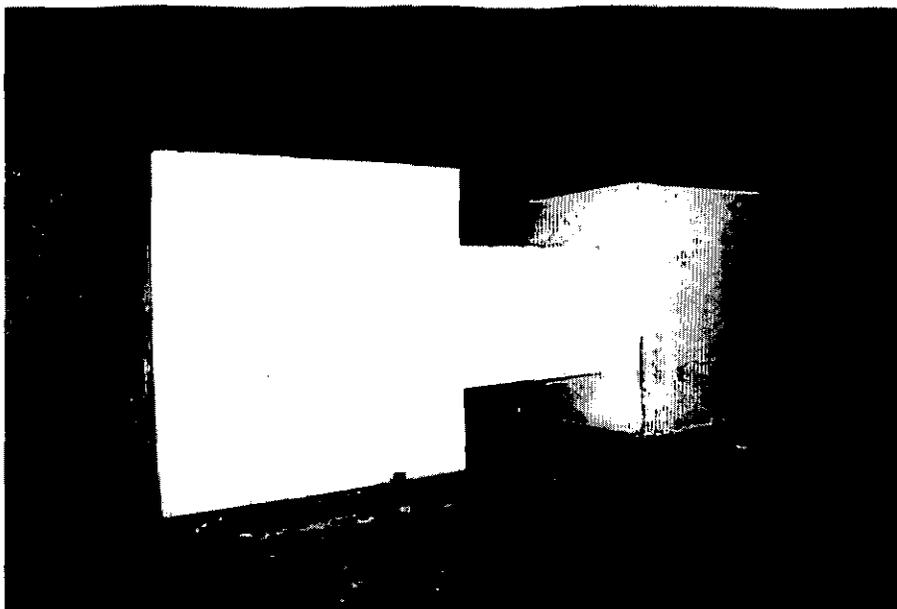


Figura 1. Diseño de las cámaras. Las flechas indican el sentido del flujo de aire



Fotografía 1. Cámaras de aislamiento y de ventilación en un sentido. En esta fotografía, del lado derecho se observa la cámara "a" y del lado izquierdo, la cámara "b", en cuya pared posterior están instalados tres ventiladores.

4.8. Análisis estadístico.

Para hacer este estudio se utilizó el programa MINITAB MTW.

4.8.1. Análisis hematológicos

Se realizó un análisis estadístico de los resultados de las pruebas hematológicas consistente en la comparación de medias con muestras independientes.

Nivel de confianza: 95%

Nivel de significancia: 5%

4.8.2. Temperatura rectal

Se estableció la media y la desviación estándar de las temperaturas registradas.

Estos experimentos se llevaron a cabo dentro de las instalaciones del Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal (CENASA), de la Dirección General de Salud Animal (DGSA), Comisión Nacional de Sanidad Agropecuaria (CONASAG), Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural (SAGAR) ubicadas en Tecámac, Estado de México.

5. RESULTADOS

5.1 Experimento 1. Transmisión del VFPC a cerdos susceptibles, por aire contaminado con aerosoles.

Mediciones de temperatura ambiente, humedad y velocidad del aire en el interior de las cámaras.

La temperatura promedio del interior de las cámaras fue de 25 °C, con una humedad ambiental promedio de 70 a 80%.

El aire fluyó primero a través de la cámara con cerdos infectados y pasó después a la cámara con los lechones susceptibles.

La tasa de ventilación de las cámaras fue constante ya que los tres ventiladores permanecieron encendidos durante las 86 horas que los cerdos estuvieron dentro de las mismas. La tasa de ventilación fue de 0.85 m³/min/cerdo.

La velocidad del aire entrante a las cámaras fue de 2m /seg.

5.1.1 . Registros de la temperatura rectal :

En el cuadro 2, se observan las temperaturas promedio registradas durante el experimento, las cuales fueron graficadas.

a) Grupo 1 "A": Cerdos inoculados con la cepa ALD del VFPC (Gráfica 1). En ella es posible observar cómo, al tercer día postinoculación, la temperatura rectal de los cerdos se incrementó en un promedio aproximado de un grado centígrado, si se compara con la temperatura que tenían antes de ser inoculados, éstos presentaron fiebre que varió de 39.2 °C a 41.5 °C hasta el día 7 postinoculación, cuando se les aplicó eutanasia.

b) Grupo 1 "B". Cerdos susceptibles expuestos al aire procedente de los lechones inoculados (Gráfica 2).

En la gráfica se observa que los cerdos de este grupo al día siguiente de que fueron sacados de la cámara "b" mostraron fiebre de 39.8 hasta 40.6. Dos de ellos presentaron hipotermia antes de morir (37.8 °C y 38 °C).

5.1.2. Signos clínicos

5.1.2.1. Grupo 1 "A": Cerdos inoculados vía intramuscular con la cepa ALD del VFPC .

A los tres días postinoculación, los cuatro lechones mostraron leve anorexia y eritema cutáneo, así como leve letargia.

Los días cuatro, cinco y seis postinoculación, cuando estuvieron en el interior de la cámara, mostraron los mismos signos antes descritos pero en grado de moderado a severo, así como tendencia a permanecer apilados. Hozaban dentro del comedero, pero sin comer y después se retiraban del comedero.

El día siete postinoculación (día en que fueron sacrificados por eutanasia), mostraron los siguientes signos:

No. 9 : Hembra de 53 días de edad, con un peso aproximado de 20 Kg y regulares condiciones de carnes. Presentó anorexia, leve eritema cutáneo en el vientre y cara interna de los miembros anteriores y diarrea semilíquida de color verde esmeralda y con temperatura rectal de 41.6 °C.

No. 10. Hembra de 53 días de edad, con un peso aproximado de 20 Kg y en regulares condiciones de carnes. Presentó anorexia y leve letargia con temperatura rectal de 40.6 °C.

No. 11. Hembra de 53 días de edad, con regulares condiciones de carnes. Presentó anorexia y leve letargia con temperatura rectal de 41.1°C.

No. 12. Hembra 53 días de edad, regulares condiciones de carnes. Presentó anorexia y letargia. Cuando se le forzó a moverse mostró opistótonos, nistagmus, trismos, ataxia posterior y diarrea semilíquida color verde con temperatura rectal de 40.7°C.

Cuadro 2. Resumen de los registros de temperaturas promedio de los cerdos de los cuatro grupos.

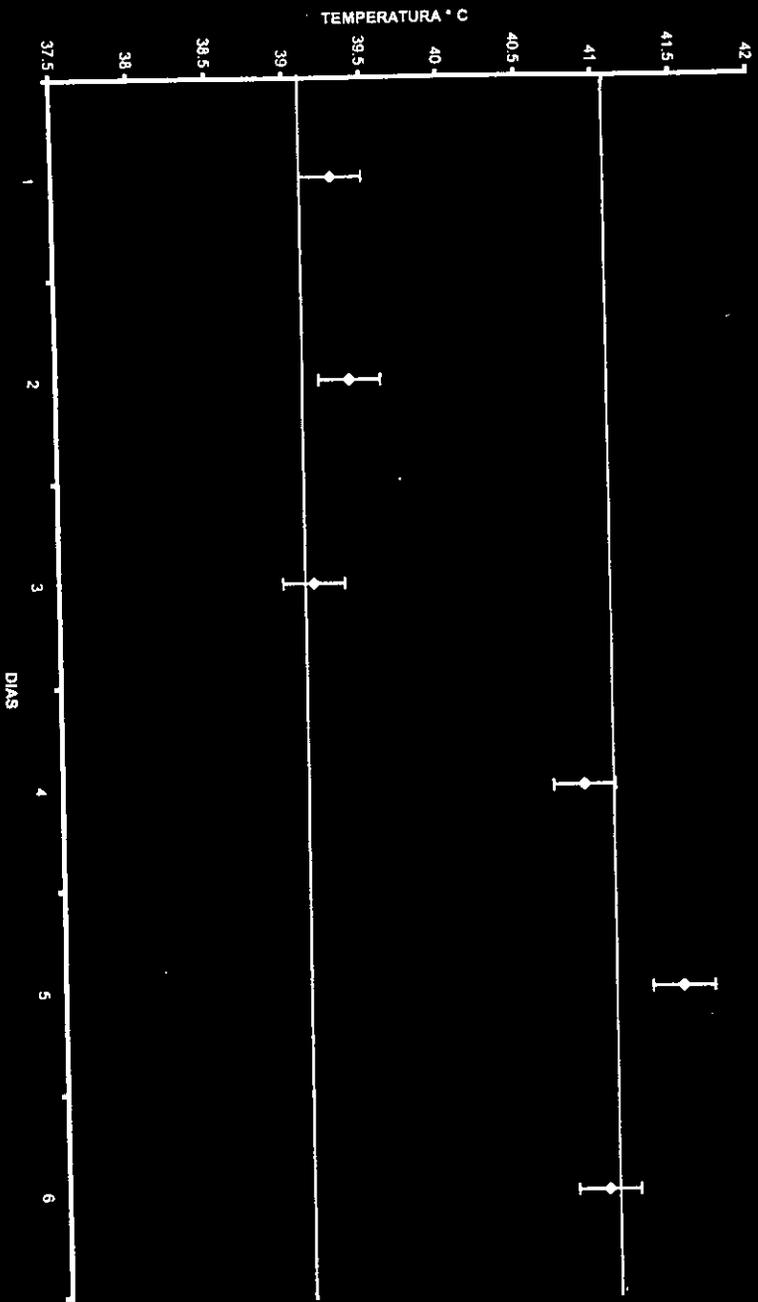
DÍAS	Experimento 1		Experimento 2	
	Cerdos inoculados Grupo 1 "A"	Cerdos receptores de aerosoles Grupo 1 "B"	Cerdos vacunados inoculados Grupo 2 "A"	Cerdos Receptores de aerosoles Grupo 2 "B"
1	39.2	39.8	39.0	39.7
6	40.0	40.1	38.8	39.0
12		40.6	38.6	39.1
18		40.5	38.8	39.0
24		40.2		40.4
30				40.0
36				39.4

Se presentan temperaturas promedio porque el número de días en que fueron registradas fue distinto para cada grupo experimental.

Experimento 1. La temperatura rectal de los cerdos del grupo "A" se incrementó en casi un grado centígrado, si se compara con la temperatura que tenían antes de ser inoculados. El grupo "B" presentó fiebre que varió de 39.8°C a 40.5 °C .

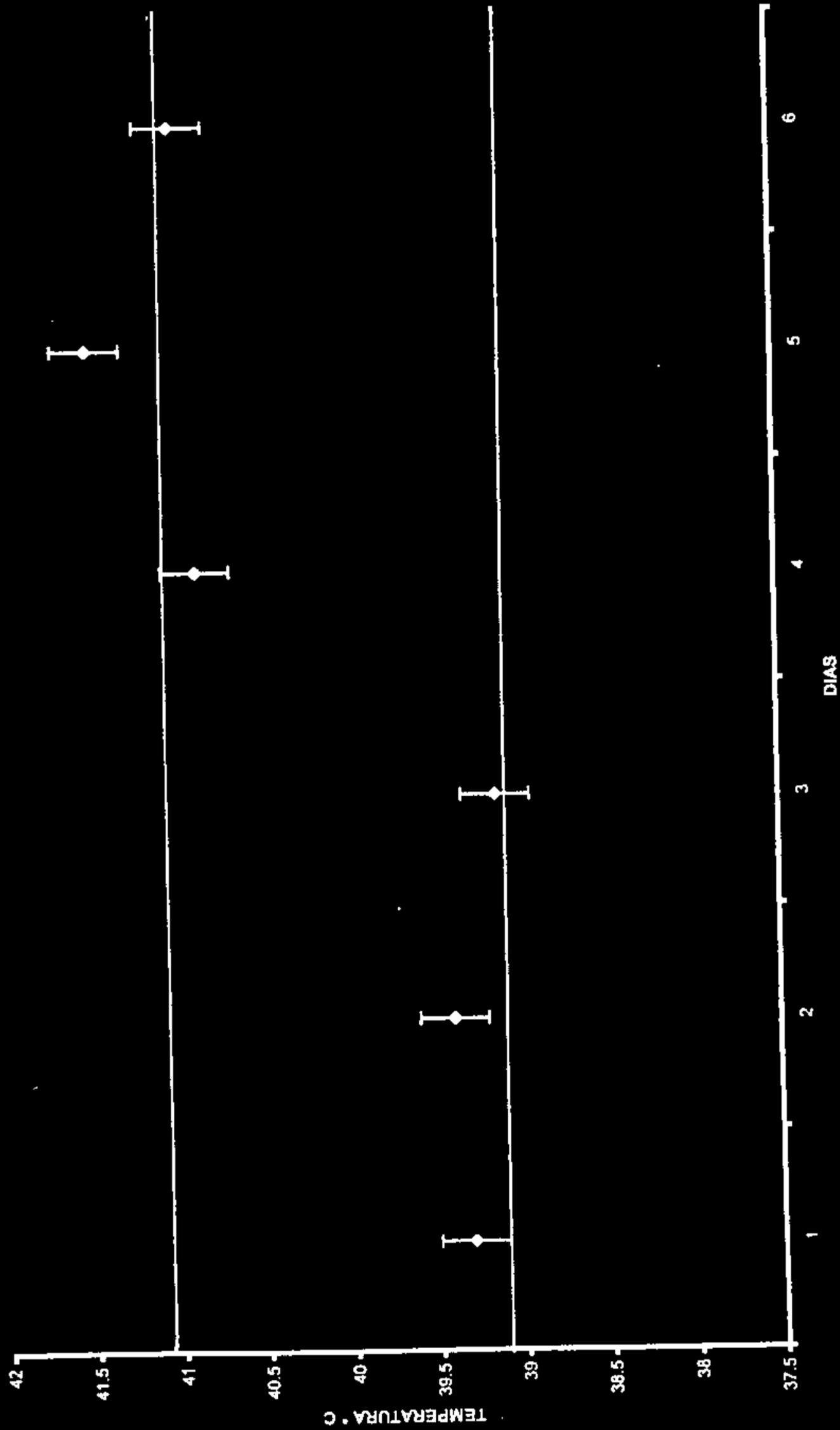
Experimento 2. En el grupo "A", la temperatura de los cerdos se mantuvo dentro de límites normales. El grupo "B", presentó ligeros incrementos de temperatura.

Gráfica 1. Temperatura promedio del grupo 1 "A".



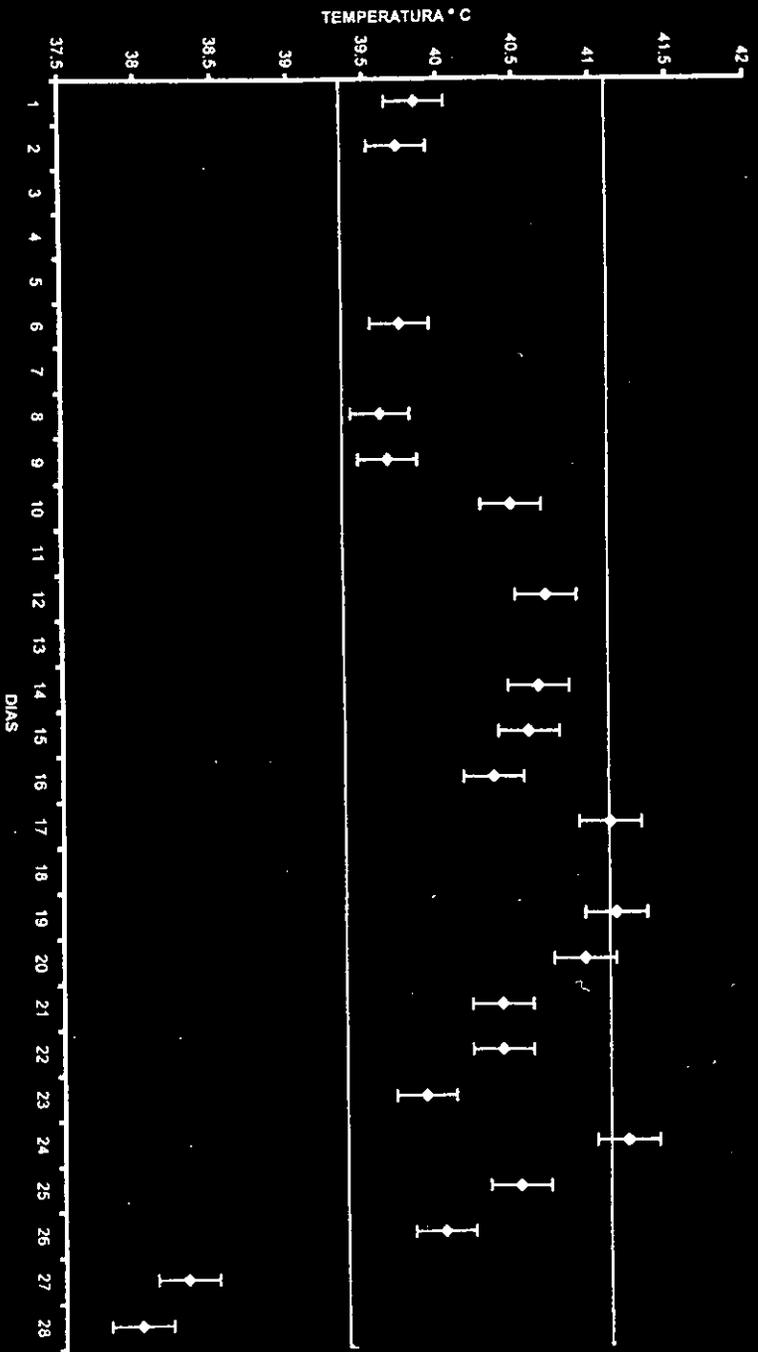
Cerdos inoculados con la "cepa" ALD del VFPC, los cuales mostraron fiebre desde el cuarto día postinoculación, la cual persistió hasta que se les aplicó eutanasia. CENASA Oct.1998.

Gráfica 1. Temperatura promedio del grupo 1 "A".



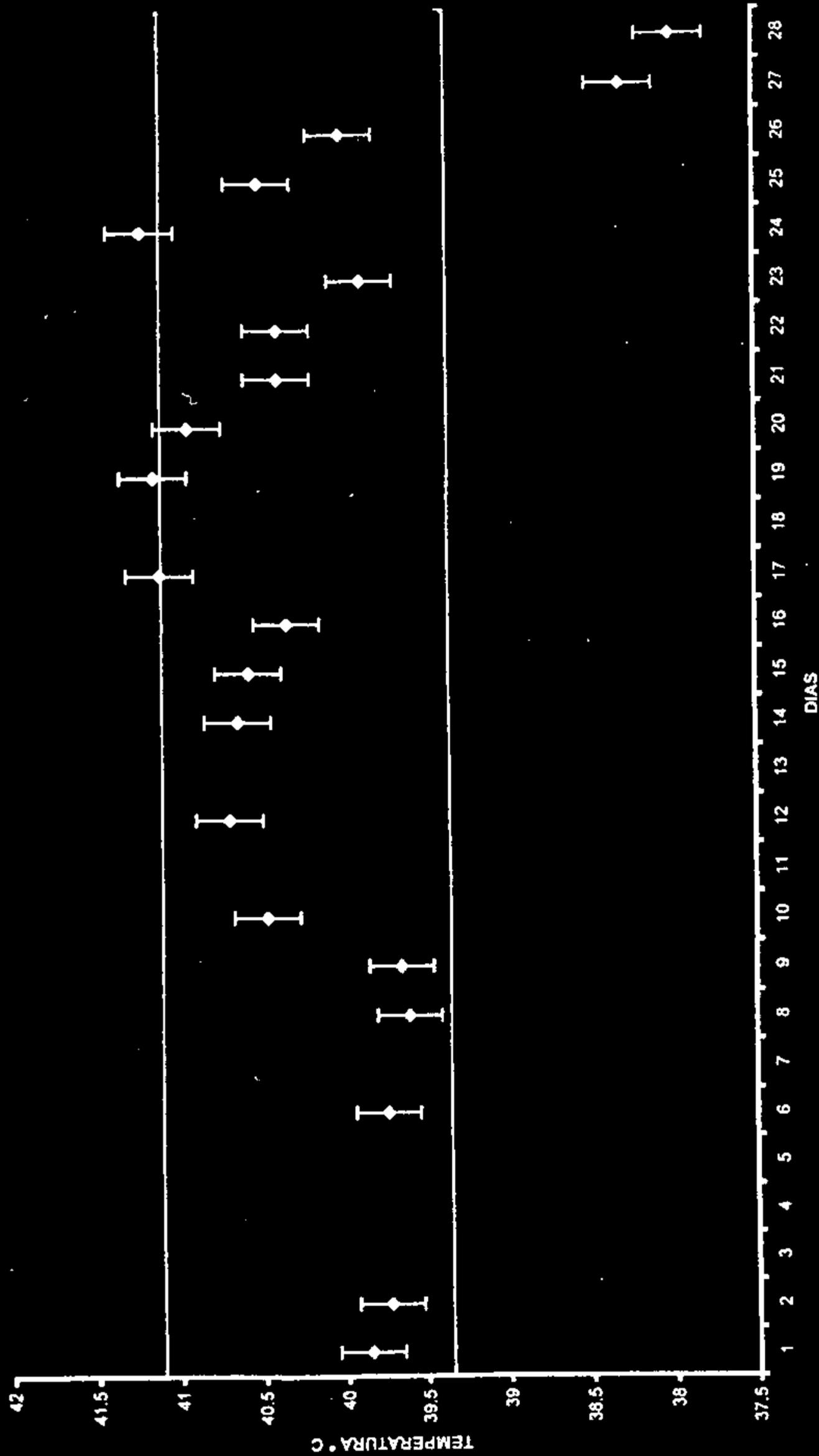
Cerdos inoculados con la "cepa" ALD del VFPC, los cuales mostraron fiebre desde el cuarto día postinoculación, la cual persistió hasta que se les aplicó eutanasia. CENASA Oct.1998.

Grafica 2. Temperatura promedio del grupo 1 "B".



Cerdos receptores de los aerosoles presuntamente infectados. Este grupo presentó fiebre desde el cuarto día postexposición. Dos de ellos mostraron hipotermia antes de morir. CENASA Oct - 98.

Grafica 2. Temperatura promedio del grupo 1 "B".



Cerdos receptores de los aerosoles presuntamente infectados. Este grupo presentó fiebre desde el cuarto día postexposición. Dos de ellos mostraron hipotermia antes de morir. CENASA Oct - 98.

5.1.2.2. Grupo 1 "B": Cerdos susceptibles expuestos al aire procedente de los lechones previamente inoculados con el VFPC.

A los cuatro días* después de haber inhalado el aire contaminado, los cuatro lechones no mostraron signos de enfermedad ; a partir del día 8, tres de ellos (Nos. 13,14 y 16) mostraron tendencia a permanecer apilados y al momento de darles de comer sólo se acercaban a hozar en el alimento, pero sin comer.

No. 13 : Hembra de 53 días de edad, con un peso aproximado de 25 Kg y en regulares condiciones de carnes.

El día siete mostró anorexia.

A partir del día 8 mostró hiperexcitabilidad, temblores musculares, eritema cutáneo en las orejas, vientre y cara interna de los miembros anteriores y posteriores y pelo hirsuto.

El día 12 además de lo anterior, presentó postración, opistótonos y movimientos de carrera.

Murió el día 14.

No. 14. Hembra de 53 días de edad, con un peso aproximado de 25 Kg con regulares condiciones de carnes.

El día siete mostró anorexia. A partir del día 8 mostró severo eritema cutáneo en las orejas, tórax y vientre así como diarrea semilíquida.

Desde el día 16 presentó: además de lo anterior, postración, depresión y temblores musculares.

El día 19 presentó además de los signos mencionados severa cianosis de la piel de las orejas, de la región oronasal, tórax y vientre. El día 20 presentó prolapso rectal. Murió el día 21.

No. 15. Hembra de 53 días de edad en regulares condiciones de carnes y con un peso aproximado de 30 Kg.

A partir del día 16 mostró anorexia y pelo hirsuto.

Desde el día 20 presentó una pequeña zona de eritema en el lado izquierdo de la región oronasal, la que evolucionó hasta convertirse en una zona de necrosis de aproximadamente 2 cm de diámetro, que afectaba hasta el cornete nasal izquierdo. Desde esta fecha, sólo metía el hocico en el alimento y parecía que iba a comer pero sólo lo movía y después se retiraba a descansar.

* En este capítulo, día o días se refiere a días postexposición a los aerosoles.

El día 27 estaba postrada y hacía movimientos de carrera; si se le forzaba a caminar, caminaba en círculos y con ataxia.

El día 28 p.i., se le aplicó la eutanasia.

No. 16. Hembra de 53 días de edad en regulares condiciones de carnes, con un peso aproximado de 30 Kg.

El día 9 post-inhalación mostró anorexia y pelo hirsuto, a partir del día 11 p.i., mostró leve eritema cutáneo en orejas, tórax, vientre y región perianal además de diarrea semilíquida.

El día 20 presentó prolapso rectal, murió el día 21.

5.1.3 Hemogramas

En los hemogramas efectuados tres días antes de la inoculación con el VFPC a los grupos 1 "A" y 2 "A" y antes de la exposición a los aerosoles grupos 1 "B" y 2 "B", no se observaron cambios significativos en las cantidades de leucocitos, eritrocitos o hemoglobina (cuadro 3).

Sin embargo, los hemogramas efectuados 4 días después de que los cerdos de los grupos 1 "A" y 2 "A" fueron inoculados o expuestos a los aerosoles, mostraron linfopenia, neutropenia y eosinopenia además de vacuolización tóxica.

Cuadro No. 3 Cuentas leucocitarias de los grupos de cerdos desafiados (1 "A" y 2 "A") y receptores de los aerosoles (1 "B" y 2 "B").

Desafío Grupos	Antes* Leucocitos / mm ³ Media y Desviación estandar	Después** Leucocitos / mm ³ Media y Desviación estandar
1 "A"	18975 +/- 3930	11225 +/- 2926
1"B"	17463 +/- 4878	11388 +/- 2837
2"A"	13413 +/- 2848	13500 +/- 3213
2"B"	22413 +/- 4018	19038 +/- 2052

* Leucocitos encontrados antes del desafío.

** Leucocitos encontrados después del desafío

5.1.4. PATOLOGÍA

5.1.4.1. GRUPO 1 "A".

Los lechones inoculados con el VFPC, fueron sacrificados por eutanasia el día 7 postinoculación. Desarrollaron tonsilitis purulenta, hemorragias en nódulos linfoides, infartos en bazo y úlceras en válvula ileocecal (Cuadro 4).

5.1.4.2. GRUPO 1 "B".

Estos cerdos murieron a consecuencia de la FPC a partir del día 14 y hasta el día 28 postexposición a los aerosoles. Desarrollaron tonsilitis purulenta, hemorragias en nódulos linfoides, infartos en bazo y úlceras en válvula ileocecal, (Cuadro 4). Uno de los lechones de este grupo, a partir del día 8 postexposición, mostró rinitis necrosante focal y prolapso rectal.

El examen histológico del bazo y de nódulos linfoides reveló necrosis y/o atrofia de células linfoides en todos los lechones de los dos grupos y meningoencefalitis no supurativa con vasculitis, en tres de los cuatro lechones de cada grupo.

Cuadro 4. Resumen de los resultados de los estudios de Patología.

Cerdos inoculados Grupo 1 "A"
Necropsia
Tonsilitis fibrinopurulenta ¾
Linfadenomegalia 4/4
Infartos esplénicos 3/4
Ileotiflitis ulcerativa 3/4
Petequias en corteza renal ¾
Histopatología
Tonsilitis necrótica 3/4
Edema y necrosis multifocal 4/4
Atrofia linfoide 4/4
Necrosis focal ¾
Atrofia linfoide 4/4
Enteritis ulcerativa ¾
Hemorragias multifocales ¾
Meningoencefalitis no supurativa con vasculitis 3/4

Cerdos receptores de los aerosoles Grupo 1 "B"
Necropsia
Rinitis necrosante focal ¼
Tonsilitis fibrinopurulenta ¼
Linfadenomegalia 4/4
Infartos esplénicos 1/4
Ileotiflitis ulcerativa 4/4
Petequias en corteza renal ¾
Prolapso rectal 2/4
Neumonía 15-60% SLP 4/4
Histopatología
Rinitis necrotica focal ¼
Tonsilitis necrótica multifocal 4/4
Edema 4/4, necrosis multifocal ¼
Atrofia linfoide ¾
Necrosis focal ¼
Atrofia linfoide 2/4
Hematopoyesis extramedular ¼
Enteritis ulcerativa 4/4
Hemorragias multifocales ¾
Meningoencefalitis no supurativa con vasculitis 4/4
Proctitis necrótica 2/4
Bronconeumonía 4/4

Cuadro 5. Resumen comparativo de los hallazgos morfológicos observados a la necropsia de los cuatro grupos experimentales.

Patología	Experimento 1		Experimento 2	
	Cerdos inoculados Grupo 1 "A"	Cerdos receptores de los aerosoles Grupo 1 "B"	Cerdos vacunados e inoculados Grupo 2 "A"	Cerdos receptores de los aerosoles Grupo 2 "B"
Tonsilas con focos necróticos	3/4	1/4	0/4	0/4
Linfadenomegalia	4/4	4/4	2/4 LEVE	0/4
Nódulos linfáticos con hemorragia difusa	4/4	4/4	0/4	0/4
Infartos en bazo	4/4	3/4	0/4	0/4
Petequias en corteza renal	3/4	3/4	0/4	0/4
Hemorragia en tracto digestivo	3/4	3/4	0/4	0/4
Úlceras botonasas en intestino	3/4	3/4	0/4	0/4
Prolapso rectal	0/4	2/4	0/4	0/4
Consolidación en lóbulos pulmonares	1/4	4/4	0/4	0/4
Rinitis purulenta	0/4	1/4	0/4	0/4
Histopatología				
Tonsilitis necrótica fibrinopurulenta	3/4	4/4	0/4	0/4
Nódulos linfoides: depresión de linfocitos, atrofia linfoide e hiperplasia reticular	4/4	3/4	4/4 LEVE	4/4 MODERADA
Bazo: trombosis en capilares	4/4	4/4	0/4	0/4
Hemorragia medular renal	3/4	3/4	0/4	0/4
Enteritis ulcerativa	3/4	3/4	0/4	0/4
Enteritis proliferativa difusa	3/4	3/4	0/4	0/4
Hemorragias multifocales	3/4	3/4	0/4	0/4
Bronconeumonía catarral/fibrinosa	1/4	4/4	0/4	0/4
Meningoencefalitis no supurativa y vasculitis	3/4	4/4	0/4	0/4
Proctitis necrótica	0/4	2/4	0/4	0/4

5.1.5.1 hallazgos de necropsia y de histopatología. Grupo 1 “A”.

Cerdo 9

Diagnóstico morfológico:

Eritema cutáneo, severa tonsilitis fibrinopurulenta difusa; severa congestión y linfadenomegalia generalizada. Moderada a severa gastritis erosiva localmente extensiva subaguda. Severos infartos esplénicos multifocales. Severa ileotiflitis ulcerativa multifocal (úlceras botonosas). Severa colitis ulcerativa multifocal. Múltiples hemorragias petequiales en la corteza renal.

Histopatología: Meningoencefalitis no supurativa focal leve con vasculitis. Tonsilitis necrótica severa. Infartos múltiples en nódulos linfoides. Infartos y depresión linfoide moderada en bazo. Ileotiflitis ulcerativa

Diagnóstico final: Fiebre porcina clásica

Cerdo 10

Diagnóstico morfológico: Eritema cutáneo; severa tonsilitis purulenta difusa. Severa congestión, severas hemorragias y linfadenomegalia generalizada. Severa gastritis erosiva localmente extensiva. Severos infartos esplénicos multifocales. Severa ileotiflitis ulcerativa multifocal (úlceras botonosas). Petequias y equimosis en la mucosa cecal. Múltiples hemorragias petequiales en la corteza renal.

Histopatología: Meningoencefalitis no supurativa leve con vasculitis y/o necrosis fibrinoide. Tonsilitis necrótica severa. Infartos escasos y depresión linfoide moderada en nódulos linfoides. Ileotiflitis ulcerativa.

Diagnóstico final: Fiebre porcina clásica

Cerdo 11

Diagnóstico morfológico: Linfadenomegalia generalizada y escasas petequias corticales. Severa gastritis en región fúndica y cardial. Tonsilas y bazo: Sin cambios patológicos aparentes.

Histopatología: Depresión linfoide esplénica moderada. Nódulo linfoide con hemorragias corticales y depresión linfoide moderada. Severa metaplasia gástrica escamosa.

Diagnóstico final: Atrofia del tejido linfoide, asociada a infección por VFPC.

Cerdo 12

Diagnóstico morfológico: Leve tonsilitis abscedativa focal . Moderada congestión y linfadenomegalia generalizada. Moderada gastritis. Moderado infarto esplénico focal. Leve ileotiflitis ulcerativa multifocal (úlceras botonosas). Escasas hemorragias petequiales en corteza renal. Múltiples hemorragias petequiales en mucosa vesical.

Histopatología: Moderada meningoencefalitis no supurativa difusa subaguda. Linfadenomegalia y congestión moderada. Tonsilitis abscedativa leve. Infarto esplénico focal. Leve tiflitis ulcerativa focal. Hemorragias petequiales abundantes en glomérulos y tejido intersticial.

Diagnóstico final: Fiebre porcina clásica.

5.1.6.1 Aislamiento viral (Grupo 1 “A”)

A partir de las muestras de sangre desfibrinada del día siete postinoculación se aisló el VFPC con un título de $10^{4.5}$ DICC₅₀.

De los tejidos linfoides colectados el día 11 postinoculación, se aisló el VFPC con un título de $10^{2.1}$ del cerdo No. 11. De los tejidos linfoides colectados el día 11 postinoculación, se aisló el VFPC con un título de $10^{3.1}$ del cerdo No. 9 y $10^{3.6}$ DICC₅₀ de los cerdos Nos. 10 y 12 (Cuadros 6 y 7).

5.1.6.2 Inmunofluorescencia directa

En los tejidos linfoides colectados el día 11 postinoculación se obtuvo un resultado positivo al realizar la prueba de inmunofluorescencia directa (Cuadros 6 y 7).

5.1.6.3 Inmunoperoxidasa

En las muestras de suero sanguíneo colectadas tres días antes de inocular a los cerdos con el VFPC, se obtuvo resultado negativo a la presencia de anticuerpos contra el VFPC. En las muestras del día 11 p.i., se obtuvo resultado positivo a la presencia de anticuerpos contra el VFPC (Cuadros 6 y 7).

Cuadro 6. Resumen de los resultados de los análisis de laboratorio efectuados en muestras tomadas de los cerdos de los grupos 1 "A" y 1 "B".

Cerdos inoculados (grupo 1 "A").

IF para VFPC Visceras 8 días P.i.	Aislamiento VFPC Sangre 8 días P.i. título	Aislamiento VFPC Org.linf. 8 días P.i. título	Inmunoperoxidasa Suero 8 días P.i.
+	+ 10 ^{4.5}	+ 10 ^{3.1}	+
+	+ 10 ^{4.5}	+ 10 ^{3.6}	+
+	+ 10 ^{4.5}	+ 10 ^{2.1}	+
+	+ 10 ^{4.5}	+ 10 ^{3.6}	+

En este cuadro se puede observar que el VFPC inoculado fue recuperado de los órganos linfoides y de la sangre de todos los cerdos de este grupo, así como su presencia fue evidenciada por la prueba de inmunofluorescencia (IF).

Cerdos receptores de los aerosoles presuntamente infectados (grupo 1 "B").

IF para VFPC Visceras Días Postexposicion a los aerosoles contaminados	Aislamiento VFPC Sangre	Aislamiento VFPC Organos linfoides	Inmunoperoxidasa Suero día 12 Postexposicion a los aerosoles contaminados
+ 14 días	+ 10 ^{4.6}	+ 10 ^{3.1}	+
+ 21 días	+ 10 ^{4.5}	+ 10 ^{3.6}	+
+ 28 días	+ 10 ^{4.6}	+ 10 ^{2.1}	+
+ 21 días	+ 10 ^{4.6}	+ 10 ^{3.6}	+

Se observa que los resultados de los análisis de laboratorio confirman que sí hubo transmisión del VFPC a través de aerosoles, ya que el VFPC fue recuperado de los órganos linfoides y de la sangre de todos los cerdos de este grupo, así como su presencia fue evidenciada por la prueba de inmunofluorescencia (IF)

Cuadro 7. Resumen de los resultados de los estudios de laboratorio. Experimentos 1 y 2.

Días postinoculación/ postexposición	Experimento 1		Experimento 2	
	Cerdos inoculados	Cerdos receptores de los aerosoles	Cerdos vacunados inoculados	Cerdos receptores de los aerosoles
8	+++ (4/4)	+++ (4/4)	++ (4/4)	
14		+++ (4/4)		
21		+++ (4/4)		
28		+++ (4/4)		
30				+(4/4)
Aislamiento del virus de sangre (promedio)				
4				-(4/4)*
8	10 4.5 (4/4)		+(3/4)*	
14		10 4.6 (1/4)		
17				-(4/4)*
21		10 4.5 (1/4)		
28		10 4.6 (2/4)		
Aislamiento del virus de órganos linfoides (promedio)				
8	10 3.1 (4/4)		+(3/4)*	
14		10 3.1 (1/4)		
21		10 3.6 (1/4)		
28		10 3.2 (2/4)		
Aislamiento del virus de líquidos residuales				
8			+(4/4)*	-(4/4)**
Prueba de inmuno-peroxidasa				
8 postinoculación	+(4/4)		+(4/4)	
12 postexposición		+(4/4)		
14 postvacunación			+(4/4)	-(4/4)
30 postexposición				-(4/4)

* no se determinó el título viral **días postexposición

En este cuadro se puede observar comparativamente, como los resultados de las pruebas de laboratorio evidenciaron la transmisión del VFPC en el experimento 1. En el experimento 2 los cerdos receptores de los aerosoles, no se enfermaron clínicamente de FPC, aunque es factible que el resultado positivo que se obtuvo en la prueba de inmunofluorescencia se haya debido a que los cerdos tuvieron contacto con un pestivirus o con algún agente etiológico antigénicamente similar al Género pestivirus.

5.1.5.2.

GRUPO 1 "B" Cerdos receptores de los aerosoles presuntamente infectados.

Cerdo 13.

Hallazgos morfológicos: Severo eritema difuso. Severa linfadenomegalia y congestión difusas. Leve tonsilitis abscedativa multifocal. Severa pleurobronconeumonía fibrinohemorrágica (55%). Moderada peritonitis fibrinosa aguda. Severos infartos esplénicos múltiples. Severa ileotiflitis ulcerativa multifocal.

Histopatología: Meningoencefalitis no supurativa moderada con vasculitis y/o necrosis fibrinoide. Linfadenopatía con infartos múltiples y hemorragias. Bronconeumonía fibrinosupurativa.

Diagnóstico final: Fiebre porcina clásica.

Cerdo 14.

Hallazgos morfológicos: Severo eritema difuso y severa cianosis auricular. Severo prolapso rectal subagudo. Severa linfadenomegalia y congestión. Moderada tonsilitis abscedativa multifocal. Severa pleuroneumonía difusa (60 %). Severa ileotiflitis ulcerativa multifocal. Leves y escasas petequias en superficie cortical renal.

Histopatología: Meningoencefalitis no supurativa leve difusa con vasculitis y/o necrosis fibrinoide moderada difusa. Tonsilitis necrotica moderada multifocal. Atrofia linfoide severa además de congestión y hemorragia severa multifocal. pleurobronconeumonía fibrino purulenta severa difusa.

Enteritis ulcerativa no supurativa severa zonal. Proctitis necrótica severa difusa.

Diagnóstico final: Fiebre porcina clásica.

Cerdo 15

Hallazgos morfológicos: Severa rinitis necrosante focal, unilateral. Leve linfadenomegalia. Severa tonsilitis abscedativa multifocal. Leve a moderada bronconeumonía (15 %). Leve ileotiflitis ulcerativa focal. Leves petequias multifocales en corteza renal.

Histopatología: Tonsilitis necrótica focal leve. Hematopoyesis extramedular esplénica. Moderada bronconeumonía supurativa. Severa rinitis necrótica focal subaguda.

Diagnóstico final: Fiebre porcina clásica.

Cerdo 16.

Hallazgos morfológicos: Severo eritema cutáneo localmente extensivo. Severo prolapso rectal necrosante subagudo. Severa linfadenitis necrosante difusa. Severa tonsilitis ulcerativa difusa. Severa neumonía localmente extensiva (10%). Severa ileotiflitis ulcerativa multifocal subaguda. Moderada tiflitis ulcerativa multifocal. Severas petequias en zona cortical renal.

Histopatología: Severa meningoencefalitis no supurativa difusa con vasculitis y/o necrosis fibrinoide leve difusa. Tonsilitis necrótica severa difusa. Severa atrofia linfoide, congestión y hemorragia multifocal. Severa enteritis ulcerativa no supurativa zonal.

Diagnóstico final: Fiebre porcina clásica.

5.1.5.2.1 Aislamiento viral (Grupo 1“B”)

El día 13 postexposición a los aerosoles contaminados, se aisló el VFPC a partir de las muestras de sangre desfibrinada del cerdo No. 14, con un título de $10^{4.5}$ DICC₅₀ y de los cerdos 13, 15 y 16 con un título de $10^{4.6}$ DICC₅₀. Se aisló el VFPC de los tejidos linfoides de los cerdos Nos. 13 y 14, con un título de $10^{4.5}$ DICC₅₀ y de los cerdos Nos. 15 y 16, con un título de $10^{4.6}$ DICC₅₀ (Cuadros 6 y 7).

5.1.5.2.2 Inmunofluorescencia directa

Se obtuvo un resultado positivo en los tejidos linfoides colectados en las respectivas fechas de los exámenes postmortem, al realizar la prueba de inmunofluorescencia directa (Cuadros 6 y 7).

5.1.5.2.3 Inmunoperoxidasa

En las muestras de suero colectadas 10 días antes de que los cerdos inhalaran los aerosoles contaminados, se obtuvo un resultado negativo a anticuerpos contra el VFPC. En las muestras del día 12 postexposición, se obtuvo resultado positivo a anticuerpos contra el VFPC (Cuadros 6 y 7).

5.2. Experimento 2.

Efecto de la vacunación con la cepa PAV-250 sobre la transmisión del VFPC por aire.

RESULTADOS

Registros de la temperatura rectal:

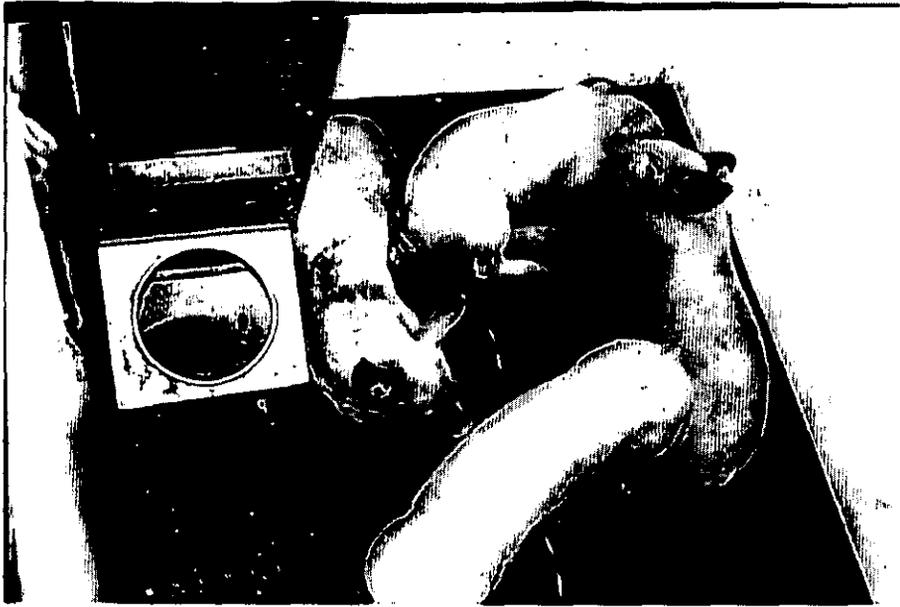
En el cuadro 2 se observan las temperaturas que fueron registradas durante el experimento, las cuales fueron graficadas.

5.2.1. Grupo 2 "A". Cerdos vacunados con la cepa PAV-250 de la vacuna contra la FPC, los cuales al día 15 postvacunación fueron desafiados con virus virulento de la FPC (Gráfica 3).

La temperatura rectal promedio de los cerdos de este grupo, se mantuvo dentro de los límites fisiológicos, de 38.6 °C a 39.3 °C.

5.2.2. Grupo 2 "B". Cerdos susceptibles expuestos al aire procedente de los cerdos previamente vacunados y desafiados (Gráfica 4).).

La temperatura rectal promedio de los cerdos de este grupo, varió de 39.1 °C a 40.0 °C en los 4 lechones.

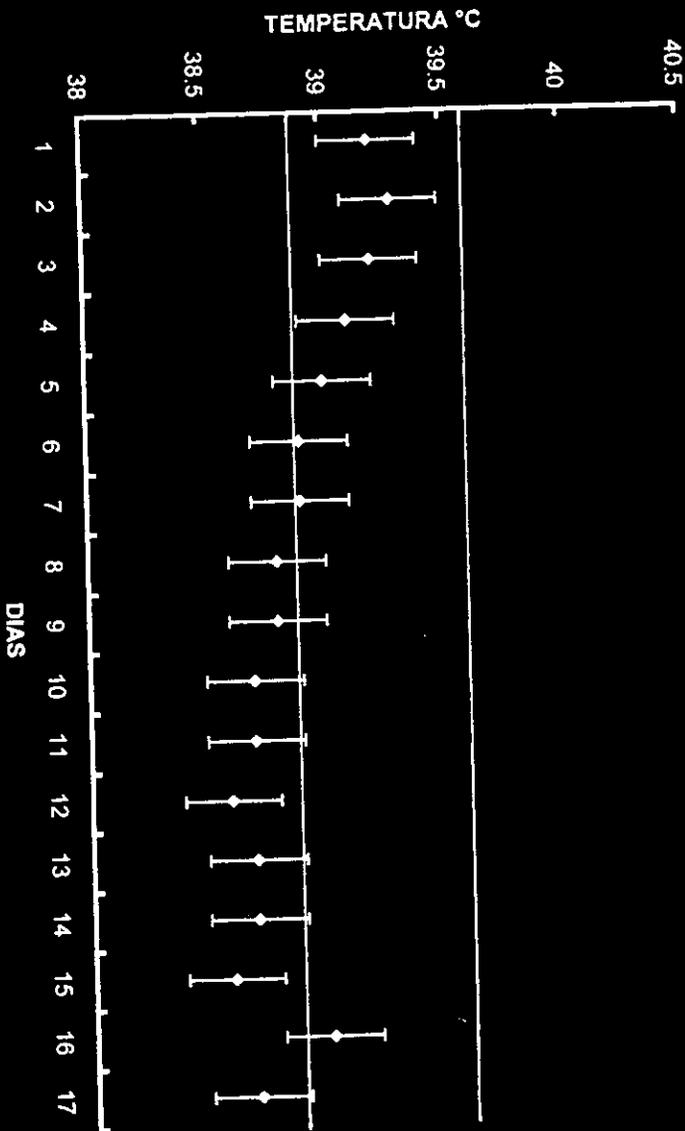


Fotografía 2. Cerdos del grupo 2 "A" vacunados con PAV-250 y desafiados con VFPC. En la pared del fondo se distinguen algunas perforaciones hechas con el fin de permitir el paso del aire hacia el interior de la cámara.



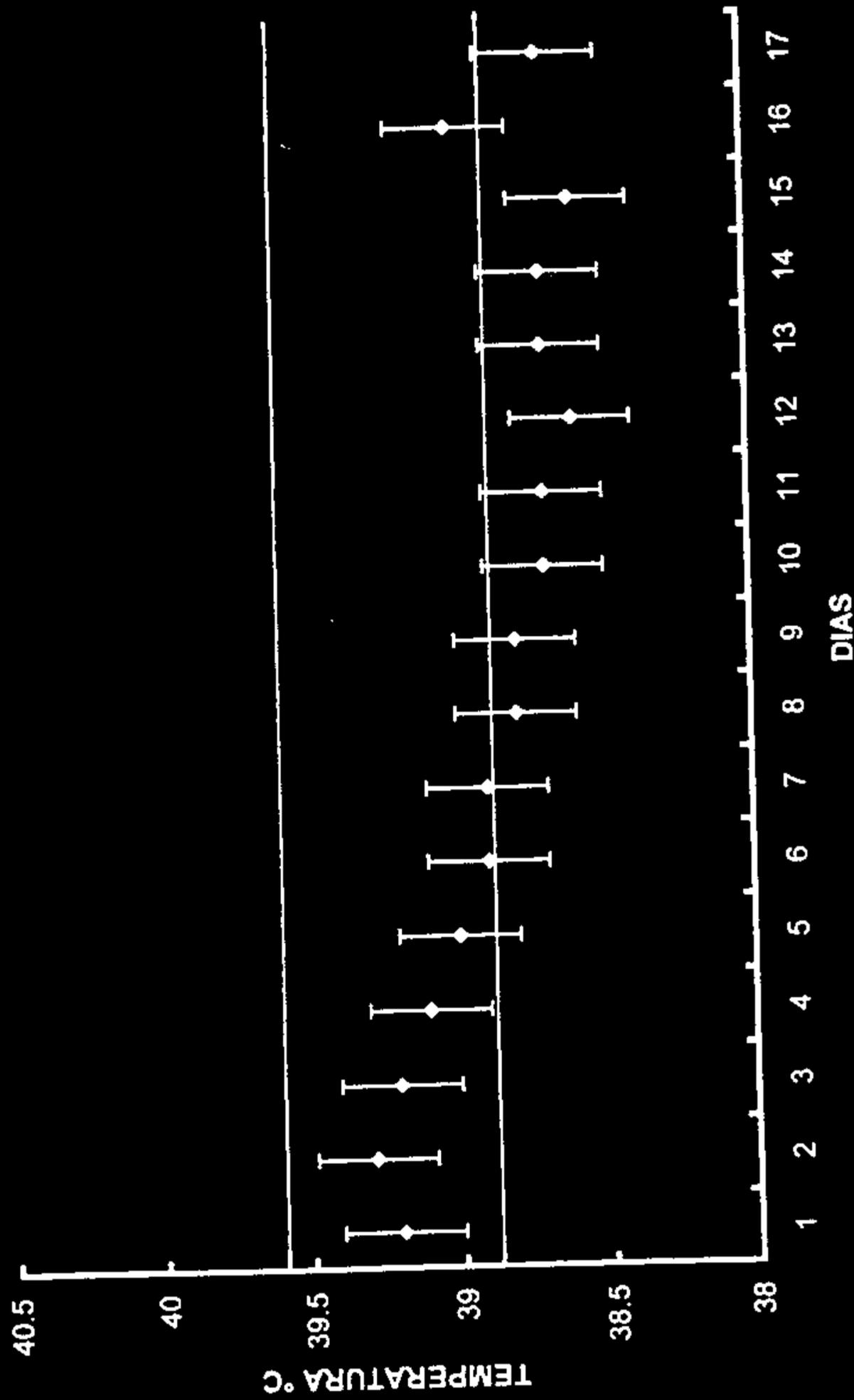
Fotografía 3. Cerdos del grupo 2 "B" receptores de los aerosoles presuntamente infectados. En la pared del lado izquierdo se observa los tres ventiladores que fueron protegidos con dos tiras de madera cada uno. En el extremo derecho se observa parte de los barrotes de madera que impidieron el paso de los animales hacia el interior del conducto que unía a las dos cámaras.

Gráfica 3. Temperatura promedio del grupo 2 "A".



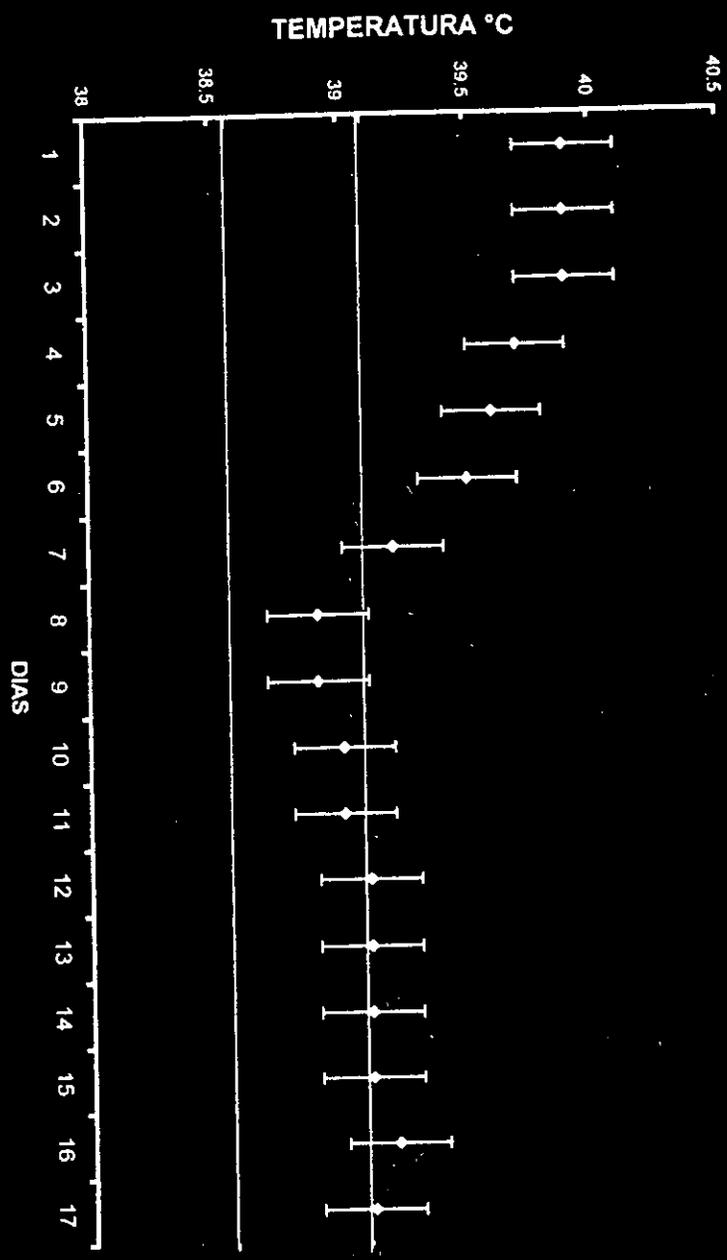
Cerdos vacunados con la cepa PAV-250 y desafiados con la cepa ALD del VFPC, los cuales mostraron temperaturas corporales dentro de los límites fisiológicos. CENASA Oct. 1998.

Gráfica 3. Temperatura promedio del grupo 2 "A".



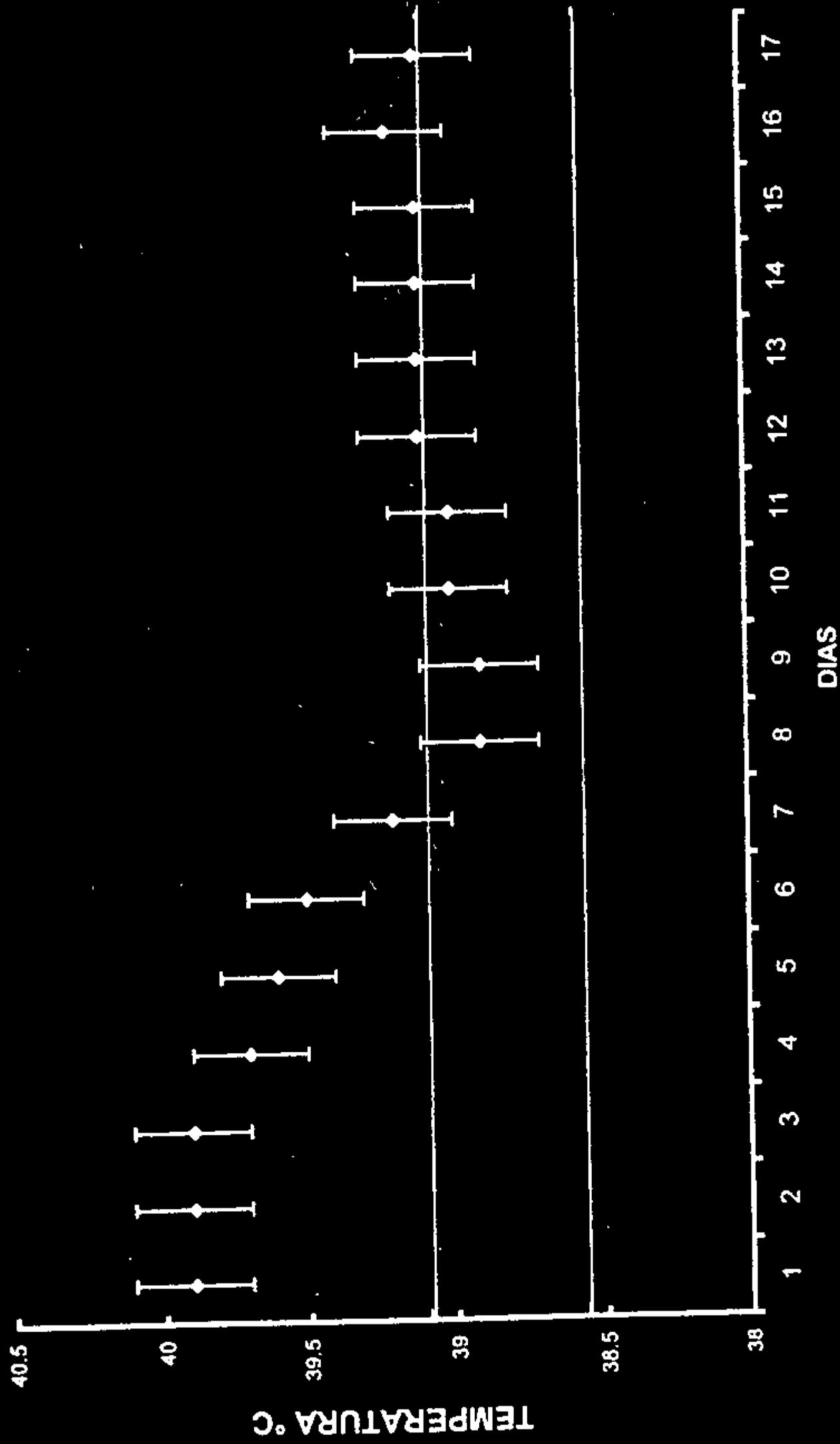
Cerdos vacunados con la cepa PAV-250 y desafiados con la cepa ALD del VFPC, los cuales mostraron temperaturas corporales dentro de los límites fisiológicos. CENASA Oct.1998.

Gráfica 4. Temperatura promedio del grupo 2 "B".



Cerdos receptores de los aerosoles presuntamente infectados. Este grupo presentó fiebre ligera, lo cual podría indicar que tuvieron contacto con algún agente etiológico antigénicamente similar al género Pestivirus. CENASA Oct. 1998.

Gráfica 4. Temperatura promedio del grupo 2 "B".



Cerdos receptores de los aerosoles presuntamente infectados. Este grupo presentó fiebre ligera, lo cual podría indicar que tuvieron contacto con algún agente etiológico antigénicamente similar al género Pestivirus. CENASA Oct.1998.

5.2. 2. Signos clínicos

Los lechones vacunados y desafiados, así como los que inhalaban el aire procedente de estos últimos no presentaron signos de FPC.

5.2.3 Hemogramas

En los hemogramas efectuados tres días antes de la vacunación (cuadro 8), no se observaron cambios significativos en las cantidades de leucocitos, eritrocitos o hemoglobina (cuadros 1 y 2).

Sin embargo, los hemogramas efectuados 7 días después de que los cerdos vacunados fueron desafiados (cuadro 9), mostraron leve linfocitosis, neutropenia y eosinopenia leves. Los hemogramas efectuados a los cerdos expuestos a los aerosoles a los 28 días postexposición, sólo mostraron leve linfocitosis en dos cerdos (Cuadro 10).

Cuadro 8. Grupo 2 "A" Valores hemáticos, tres días antes de vacunar.

IDENT	ERITROCITOS	LEUCOCITOS	HEMOGLOBINA	HEMATOCRITO	LINFOCITOS % / LINFOCITOS ABS.	MONOCITOS % / MONOCITOS ABS.	SEGMENTADOS % / SEGMENTADOS ABS.	EOSINOFILOS % / EOSINOFILOS ABS.
2	6450000	23500	13.6	42.2	65% /15275	4% /940	29% /6815	1% /235
4	7320000	17000	12.9	40.5	63% /18290	4% /690	30% /6300	1% /210
6	6980000	22500	12.4	39.0	60% /13530	5% /860	27% /6090	1% /226
8	7690000	26650	13.4	40.8	57% /15190	4% /1066	33% /8795	2% /533

Cuadro 9. Grupo 2 "A". Valores hemáticos, siete días postdesafío.

IDENT	ERITROCITOS	LEUCOCITOS	HEMOGLOBINA	HEMATOCRITO	LINFOCITOS % / LINFOCITOS ABS.	MONOCITOS % / MONOCITOS ABS.	SEGMENTADOS % / SEGMENTADOS ABS.	EOSINOFILOS % / EOSINOFILOS ABS.
2	6980000	10800	11.7	35.7	66% /14300	4% /910	26% /7100	1% /100
4	7020000	12800	13.0	40.0	80% /8400	6% /560	21% /2000	1% /215
6	6860000	18150	12.3	37.5	68% /13400	3% /920	20% /5600	1% /120
8	7240000	12250	12.1	36.5	54% /14880	4% /880	30% /8000	2% /200

Cuadro 10. Grupo 2 "B". Valores hemáticos, siete días postexposición.

IDENT	ERITROCITOS	LEUCOCITOS	HEMOGLOBINA	HEMATOCRITO	LINFOCITOS % / LINFOCITOS ABS.	MONOCITOS % / MONOCITOS ABS.	SEGMENTADOS % / SEGMENTADOS ABS.	EOSINOFILOS % / EOSINOFILOS ABS.
1	6660000	16900	13.3	42.0	67% /16100	3% /880	31% /7200	1% /220
3	6630000	21450	12.9	40.9	66% /14350	5% /700	30% /6480	1% /190
5	7210000	17850	13.8	44.0	61% /6470	6% /630	26% /6120	1% /220
7	7010000	19950	14.0	45.2	56% /15800	3% /1080	34% /8800	2% /480

5.2.4. Patología

Cuadro 11. Experimento 2. Resumen de los resultados de los estudios de Patología.

Lechones vacunados e inoculados (2 "A")
Necropsia
Leve linfadenomegalia 2/4
Leve ileotiflitis ulcerativa 4/4
Bazo: Sin cambios patológicos aparentes
Histopatología
Leve a moderada atrofia linfoide 4/4
Leve enteritis ulcerativa 4/4
Leve a moderada atrofia linfoide esplenica 3/4
Lechones receptores de los aerosoles (2 "B")
Necropsia
Nodulos linfoides SCPA 4/4
Enteritis proliferativa difusa 4/4
Bazo: Sin cambios patológicos aparentes 4/4
Histopatología
Moderada atrofia linfoide 4/4
Moderada hiperplasia epitelial difusa 4/4
Leve a atrofia linfoide esplenica 2/4
Leves hemorragias linfoides 2/4

5.2.4.1. GRUPO 2 “A”.

A estos cerdos se les aplicó eutanasia a los 62 días de edad, es decir al ser sustraídos de la cámara “a”. En el examen post mortem, se observó moderada linfadenomegalia en dos de los cuatro cerdos y grados de leve a moderado, de ileotiflitis de tipo ulcerativa . El examen histológico del bazo y de los nódulos linfoides reveló leve a moderada atrofia linfoide de distribución difusa, en todos los cerdos (Cuadro 11).

5.2.4.2. GRUPO 2 “B”. . A los cerdos que inhalaron el aire contaminado con aerosoles procedentes de los cerdos que fueron vacunados y desafiados se les aplicó eutanasia a los 92 días de edad.

En el examen post mortem únicamente se observó ileitis proliferativa.

El examen histológico del bazo y de los nódulos linfoides reveló leve a moderada atrofia linfoide de distribución difusa, en todos los cerdos de este grupo (Cuadro 11).

5.2.5.1 HALLAZGOS DE NECROPSIA Y DE HISTOPATOLOGIA

GRUPO 2 “A”.

Cerdo 2

Hallazgos morfológicos: Moderada linfadenomegalia difusa. Leve ileotiflitis ulcerativa multifocal. Hidronefrosis e hidroureter leve a moderado.

Histopatología. Leve atrofia linfoide en tonsilas y linfonodos. Leve enteritis no supurativa e hiperplasia linfoide moderada.

Diagnóstico final: Linfadenopatía

Cerdo 4.

Hallazgos morfológicos: Moderada enteritis proliferativa localmente extensiva, asociada con severas sufusiones zonales. Leve ileotiflitis ulcerativa multifocal.

Histopatología: Leve a moderada atrofia linfoide . Severa enteritis mixta focal.

Diagnóstico final: Linfadenopatía. Enteropatía de etiología bacteriana.

Cerdo 6

Hallazgos morfológicos: Moderada linfadenomegalia difusa. Leve ileotiflitis ulcerativa multifocal. Moderada a severa hidronefrosis e hidroureter.

Histopatología. Leve a moderada atrofia linfoide. Severa enteritis linfoplasmocitaria.

Diagnóstico final: Linfadenopatía . Enteropatía de etiología bacteriana.

Cerdo 8

Hallazgos morfológicos: Leve ileotiflitis ulcerativa multifocal.

Histopatología: Leve atrofia linfoide. Severa enteritis linfoplasmocitaria.

Diagnóstico final: Linfadenopatía . Enteropatía de etiología bacteriana.

5.1.5.2.1 Aislamiento viral (Grupo 2 “A”)

El día 8 postinoculación del VFPC a partir de las muestras de sangre desfibrinada se aisló el VFPC de los cerdos Nos. 2, 4 y 8, con un título de $10^{1.2}$ DICC₅₀. Del cerdo No. 6 no se aisló el VFPC.

De los tejidos linfoides, colectados el día 8 p.i., se aisló el VFPC con un título de $10^{1.2}$ DICC₅₀ de los cerdos Nos. 2, 4 y 8. Del cerdo No. 6, nuevamente no se aisló el VFPC (Cuadro No. 16).

A partir de muestras del líquido residual colectado del piso de la cámara “a” se aisló el VFPC con un título de $10^{1.2}$ DICC₅₀.

5.1.5.2.2 Inmunofluorescencia directa

En los tejidos linfoides colectados el día 7 postinoculación; se obtuvo un resultado positivo al realizar la prueba de inmunofluorescencia directa (Cuadro 16).

5.1.5.2.3 Inmunoperoxidasa

En las muestras de suero colectadas 3 días antes de ser vacunados contra FPC, se obtuvo resultado negativo a anticuerpos contra el VFPC. En las muestras obtenidas a los 14 días postvacunación se obtuvo resultado positivo a anticuerpos contra el VFPC (Cuadro 16).

Cuadro 12. Experimento 2. Efecto de la vacunación contra FPC con la cepa PAV-250 en la transmisión del VFPC.

Cerdos vacunados y desafiados.

If para VFPC Visceras 22 días posvacunación 8 días postinoculación	Aislamiento VFPC Sangre 8 días P.i.	Aislamiento VFPC Org.linf. 8 días P.i.	Inmunoperoxidasa FPC Suero 14 días Post vacunación	Aislamiento VFPC Líquidos residuales 8 días P.i.
+	+	+	+	+
+	+	+	+	+
+	-	-	+	+
+	+	+	+	+

No se determinó el título viral.

Cerdos receptores de los aerosoles presuntamente infectados.

If para VFPC Visceras 30 días post contacto	Aislamiento VFPC Sangre 4 días Postexposición	Aislamiento de sangre . 17 días Postexposición	Inmunoperoxidasa FPC Suero 14 días y 30 días Postexposición	Aislamiento VFPC Líquidos residuales 8 días Postexposición
+ *	-	-	-	-
+ *	-	-	-	-
+ *	-	-	-	-
+ *	-	-	-	-

No se determinó el título viral.

5.2.5.2 GRUPO 2 “ B”. Cerdos receptores de los aerosoles presuntamente infectados procedentes de los lechones vacunados con cepa PAV- 250 de VFPC y desafiados con un ml de VFPC cepa ALD 10^{4,3}.

Cerdo 1

Hallazgos morfológicos: Moderada enteropatía proliferativa difusa subaguda. Moderada esteatosis hepática multifocal.

Histopatología. Linfonodo: Atrofia linfoide moderada difusa, con edema subcapsular leve de linfonodos. Atrofia linfoide esplénica leve difusa.

Tumefacción renal moderada difusa.

Diagnóstico final: Linfadenopatía. Enteropatía de etiología bacteriana.

Cerdo 3

Hallazgos morfológicos: Leve a moderada enteropatía proliferativa difusa subaguda. Moderada esteatosis hepática multifocal.

Histopatología.: Atrofia linfoide linfonodular, moderada difusa, con edema subcapsular leve. Colangitis no supurativa leve focal.

Diagnóstico final: Linfadenopatía

Cerdo 5

Hallazgos morfológicos: Moderado hidropericardio. Moderada enteropatía proliferativa difusa subaguda.

Histopatología. Atrofia linfoide linfonodular moderada difusa, con edema subcapsular leve. Enteritis linfoproliferativa moderada difusa con hiperplasia de las células epiteliales.

Diagnóstico final: Linfadenopatía . Enteropatía de etiología bacteriana

Las lesiones que se observan a nivel intestinal sugieren una enfermedad bacteriana, asociada a Campylobacter sp. y/o Lawsonia sp.

Cerdo 7

Hallazgos morfológicos: Leve hidropericardio. Moderada enteropatía proliferativa difusa subaguda.

Histopatología: Atrofia linfoide linfonodular moderada difusa, con edema subcapsular leve. Atrofia linfoide esplénica leve de los centros germinativos. Enteritis linfoproliferativa moderada difusa con hiperplasia de las células epiteliales

Diagnóstico final: Linfadenopatía . Enteropatía de etiología bacteriana.

Las lesiones que se observan a nivel intestinal sugieren una enfermedad bacteriana asociada a Campylobacter sp. y/o Lawsonia sp.

5.2.5.2.1 Aislamiento viral (Grupo 2 “B”)

No se aisló el VFPC de ninguno de los cerdos de este grupo, a partir de las muestras de sangre desfibrinada colectadas los días 4 y 17 postexposición a los aerosoles contaminados.

No se aisló el VFPC de los tejidos linfoides colectados el día 30 postinhalación (cuadro 13).

No se aisló el VFPC a partir de las muestras del líquido residual colectado del piso de la cámara “b”.

5.2.5.2.2 Inmunofluorescencia directa

En las muestras de tonsilas de los cuatro cerdos de este grupo, colectados el día 30 postexposición se obtuvo un resultado positivo al realizar la prueba de inmunofluorescencia directa, aunque la cantidad de células que presentaban fluorescencia era muy pequeña y la fluorescencia en sí era muy tenue, esta se observó en el citoplasma y de apariencia fina en las células positivas. En las muestras de nódulos linfoides y de bazo, el resultado fue negativo. (Cuadro 13).

5.2.5.2.3 Inmunoperoxidasa

Se obtuvo resultado negativo a anticuerpos contra el VFPC con las muestras de suero colectadas 3 días antes de iniciar el experimento y a los 14 y 30 días postexposición a los aerosoles, (cuadro 13).

Discusión

Experimento 1. Transmisión del VFPC a cerdos susceptibles, por aire contaminado con aerosoles.

Bajo las condiciones en que se efectuó este trabajo fue posible la transmisión por aire del VFPC excretado por los cerdos previamente inoculados con una cepa patógena, ya que el VFPC infectó a los cerdos susceptibles que se encontraban a un metro de distancia.

La anterior aseveración se basa en el análisis de los resultados de:

- las gráficas de temperatura rectal y signos clínicos observados
- los análisis hematológicos
- las pruebas de inmunoperoxidasa
- las pruebas para el aislamiento viral
- las pruebas de inmunofluorescencia
- los análisis de patología macro y microscópicos

Con respecto a la vía de infección bajo condiciones naturales, es muy probable que la mayoría de las infecciones se desarrollen a partir de la exposición de las membranas mucosas orales al virus virulento contenido en agua o alimento contaminado⁸. En este experimento, mediante las cámaras de aislamiento, equipadas con "piso porcícola" y ventilación forzada en un solo sentido, los lechones susceptibles a la infección por el VFPC estuvieron inhalando durante 86 horas los aerosoles respiratorios producidos por los lechones previamente inoculados, por lo que el virus pudo colonizar la mucosa de la región orofaríngea de los cerdos receptores de los aerosoles.

Lo anterior coincide con lo que reportó Terpstra, aunque la distancia que había entre las cámaras utilizadas para este experimento fue de 1 m a diferencia de la instalada por Terpstra que fue de 7 m; asimismo él utilizó una menor velocidad del aire: de $.075 \text{ m}^3 / \text{min}$, a diferencia de la de este experimento que fue de $.85 \text{ m}^3 / \text{min}$ ¹⁴.

Por otra parte, como este experimento no fue diseñado para determinar cuántos lechones se infectaban con VFPC por permanecer dentro de la cámara, queda por esclarecer la duda de si uno o más lechones se infectaron durante su estancia en la cámara y el resto se infectó posteriormente, mientras los cuatro convivieron al ser alojados en una corraleta aislada, después de haber permanecido tres días en la cámara.

Podría sugerirse que por lo menos dos lechones: el 13 y el 14, se pudieron haber infectado en la cámara por inhalación del aire contaminado con VFPC, ya que ambos presentaron fiebre al séptimo día postcontacto con el aire contaminado.

Este último argumento podría refutarse con base en los hallazgos de Depner y colaboradores ³⁰, sobre diferencias en la susceptibilidad de diversas razas al VFPC, es decir que es posible que los otros dos lechones los cuales tardaron de 12 a 13 días en presentar fiebre, se comportaron en esa forma por tener una mayor resistencia a la infección con VFPC. Sin embargo, para este experimento, los cuatro lechones eran productos de la cruce de Yorkshire con Landrace.

En la gráfica 1, del grupo 1 "A" relativa a los cerdos inoculados con VFPC por la vía intramuscular, es posible observar cómo, al tercer día postexposición, la temperatura rectal de los lechones se incrementó en un promedio aproximado de un grado centígrado, si se compara con la temperatura que tenían antes de ser inoculados; considerando los siguientes límites de temperatura rectal como normales para cerdos: 38.7 a 39.8; promedio de 39.2 ²⁴.

Como se observa en la Gráfica 1, los lechones inoculados presentaban fiebre aún cuatro días después de haber permanecido en el interior de la cámara "a". Con base en las experiencias obtenida en el CENASA, al inocular cerdos con la cepa ALD del VFPC con un título de 10^6 DICC ₅₀, se ha observado que el pico de elevación de la temperatura usualmente se presenta entre el 4^o y el 8^o día de la enfermedad⁸. Es factible que los cerdos de este grupo, no iban a presentar otra elevación de temperatura, antes de morir. Como ya se anotó antes, los cerdos de este grupo fueron sacrificados a los cuatro días después de haber permanecido 86 horas en el interior de la cámara "a".

Se sabe que la fiebre es un mecanismo de defensa que han desarrollado algunas especies animales; sin embargo, en algunos casos el estado febril puede traer consecuencias más graves que el agente etiológico en sí ²⁴.

La fiebre es mediada por una proteína conocida como pirógeno endógeno, que es producida por los macrófagos e interactúa con los linfocitos. Se ha observado que los leucocitos de los mamíferos exhiben un máximo de actividad fagocítica a temperaturas equivalentes a las de la fiebre moderada ²⁵.

En este caso, parecería ser que la fiebre tiene poco o ningún efecto sobre la actividad del VFPC, pues se ha visto que a la par que se presenta la fiebre, hay una severa disminución en la cuenta leucocitaria ⁸.

Recientemente, se demostró que la glicoproteína E^{rns} de la envoltura del VFPC, tiene actividad de ribonucleasa, inmunosupresora. Específicamente la E^{rns} inhibe fuertemente la síntesis de proteínas de los linfocitos de diferentes especies animales sin causar daño a la membrana celular, lo que sugiere un proceso de apoptosis de los linfocitos; esto último se manifiesta como leucopenia e inmunosupresión. Este efecto, es compartido por el género pestivirus ⁴⁰.

Los signos clínicos observados en el grupo 1 "A", coinciden con los informados en la literatura consultada ^{8,11,12,13} en los siguientes aspectos:

Signos nerviosos: opistotónos, nistagmus, ataxia de tren posterior, movimientos de carrera y marcha en círculos, algunos de los cuales se observaron en los cerdos números 13 y 15, lo que se relacionó directamente con las lesiones microscópicas que se encontraron en el encéfalo de los lechones con los aretes números 9,10 y 12 del grupo 1 "A" y los cerdos del Grupo 1 "B" excepto el número 15; los cambios histológicos consistieron en diversos grados de meningoencefalitis no supurativa.

El eritema cutáneo, se presentó en los 8 lechones de este experimento durante la fase aguda de la enfermedad entre los tres seis y los ocho días después de haber sido infectados. Un lechón del grupo 1 "B" que inhaló el aire contaminado desarrolló severa dermatitis focal a partir del día 19 postexposición.

Dos lechones del grupo 1 "A" inoculado con VFPC, desarrollaron diarrea en forma aguda, mientras que dos cerdos del grupo 1 "B" que inhaló el aire contaminado, desarrollaron prolapso rectal y proctitis.

Después de revisar los datos correspondientes a los signos clínicos, se puede concluir que la cepa ALD del VFPC que se utilizó para este experimento es una "cepa" muy virulenta y en esta prueba al ser aplicada mediante aerosoles infectantes ocasiona un curso agudo ⁹. Depner y colaboradores obtuvieron un resultado distinto, al inocular intranasalmente a tres lechones destetados con la cepa Visbek/Han 95 de VFPC aislada a partir de un brote de campo y ponerlos en contacto con seis lechones susceptibles; los nueve lechones desarrollaron FPC, pero en la forma de tres síndromes distintos: tres animales desarrollaron una infección ligera y pasajera y se recuperaron completamente,

cuatro desarrollaron la forma aguda de FPC y dos más presentaron la forma crónica. El virus que utilizó fue una cepa aislada durante la epizootia de FPC de 1995 ocurrida en Alemania³⁰.

Cabe destacar la casi ausencia de lesiones macro y microscópicas en la necropsia y en la histopatología del lechón No. 11, que fue inoculado por la vía intramuscular con un ml de VFPC $10^{4.3}$ DICC₅₀ lo que podría estar relacionado con factores que afectan el curso de la infección por el VFPC que presentan algunos individuos de algunas razas³¹.

Depner y colaboradores discutieron las diferencias en la evolución clínica y en las respuestas serológicas que se han observado en los brotes de FPC en Alemania de 1993 a 1995, en los que se ha visto que los cerdos derivados de cruza tienen, en general, una mejor respuesta inmunológica que los de raza pura³⁰.

Asimismo se refieren a otros factores que pueden influir en el curso clínico de los brotes de FPC, los fisiológicos asociados con la edad de los animales y la dosis del virus con la que se hayan infectado los cerdos³¹.

Lo anterior debe tenerse en cuenta cuando se analizan los brotes de FPC, ya que hay razas más propensas a padecerla en forma crónica (por ejemplo: Pietrain cruzada con Landrace Alemán), lo cual puede jugar un papel epidemiológico importante, ya que se ha confirmado experimentalmente que pueden excretar el virus durante períodos de hasta 45 días. Es decir dichos cerdos actúan como reservorios del virus¹⁴.

En resumen, la cambiante forma de presentación de los brotes de FPC, como se ha observado en recientes epizootias en Alemania y como está sucediendo en los brotes de FPC en los estados de Jalisco, Guanajuato, Michoacán y Aguascalientes en México, pueden estar relacionados con las características genéticas de los cerdos y no exclusivamente con las propiedades de las cepas involucradas del virus de la FPC.

En los análisis hematológicos efectuados en los cerdos de los grupos 1 "A" y 1 "B", cuatro días después de la inoculación y trece días después de estar en contacto con el aire contaminado, respectivamente, se observaron grados variables de leucopenia y linfopenia, ya que los valores normales para leucocitos están entre 11 000 y 22 000 / mm³ y de 3 290 a 13 640 linfocitos / mm³. Los valores disminuidos en las células linfoides, que se encontraron en este trabajo coinciden con los valores reportados por otros autores para cerdos con FPC^{8,9,11,13}. Como ya se hizo mención en párrafos anteriores, se piensa

que este cambio es consecuencia de la apoptosis que causa la proteína E^{rns} del VFPC en los linfocitos.

Acerca de los hallazgos a la necropsia y los histopatológicos, se debe resaltar el resultado del lechón número 11, del grupo de los inoculados por la vía intramuscular y del No. 15 del grupo de los que inhalaban el aire contaminado. En el lechón 11, casi no se observaron lesiones a la necropsia ni a la histopatología, sin embargo se aisló el VFPC a partir de las muestras de sangre desfibrinada.

Al cerdo No. 15, del Grupo 1 "B" se le aplicó eutanasia el día 28 postexposición a los aerosoles contaminados ya que presentaba severa queilitis y rinitis necrosante, además de postración, movimientos de carrera y cuando se le forzaba a caminar lo hacía en círculos y con ataxia. En el estudio histológico de este lechón no se observó meningoencefalitis no supurativa, a pesar de los signos nerviosos que presentó antes de la eutanasia. Esto es coincidente con lo reportado por Depner quien también observó ausencia de infiltración linfocítica perivascular en los cortes histológicos de encéfalos de porcinos que estuvieron en contacto con lechones inoculados con el VFPC³⁰.

Es factible que en condiciones de campo estos dos lechones (11 y 15) no hubieran sido diagnosticados con FPC después de hacerles la necropsia. Estos hechos coinciden con lo reportado por Depner y colaboradores²⁵, quienes observaron algo similar en dos lechones que presentaron FPC de curso crónico.

Este hecho refuerza la necesidad de establecer en los laboratorios de diagnóstico veterinario donde se lleve a cabo el diagnóstico, el procedimiento de emitir el diagnóstico basado en por lo menos dos pruebas de laboratorio distintas: inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa en cortes de tejidos congelados³², o inmunofluorescencia y ELISA de captura o inmunofluorescencia y aislamiento e identificación viral en cultivos celulares, para evitar la posibilidad de emitir un diagnóstico falso negativo sobre todo en muestras provenientes de zonas en erradicación y en las libres del VFPC.

La prueba de inmunofluorescencia ha mostrado ser una prueba sensible y específica^{32,38} aunque cuando se usan conjugados policlonales no es útil para distinguir cepas del VFPC. Para ello se usan anticuerpos monoclonales marcados con isotiocianato de fluoresceína^{28,33,35,38}. Al ser aplicada a las muestras de los lechones de los grupos 1 "A" y 1 "B", los resultados fueron

muy claros, excepto en las muestras del lechón No. 11, en el cual la fluorescencia fue muy leve y en muy pocas células. Esto es compatible con los cambios patológicos macro y microscópicos ya descritos y que podrían estar relacionados con la raza o con la edad de este lechón.

La prueba de inmunoperoxidasa para detectar anticuerpos contra el VFPC en el suero, mostró un alto grado de sensibilidad al ser comparada con la prueba de inmunofluorescencia, por lo que se recomienda su utilización para pruebas serológicas con fines de vigilancia epizootiológica, como prueba tamiz.

En Cuba, durante el brote de FPC que se presentó en las provincias occidentales de la isla en 1993, la Dra. Tuero y colaboradores utilizaron una prueba de inmunoperoxidasa similar a la descrita líneas arriba para detectar el VFPC en cortes de tejidos congelados con inmunoglobulinas específicas policlonales obteniendo buenos resultados, ya que tuvieron un 100% de sensibilidad y un 98% de especificidad, pues el conjugado para la prueba de inmunoperoxidasa fue capaz de detectar una concentración de hasta $10^{0.75}$ DICC₅₀ del VFPC, aunque el mismo conjugado enzimático, presentó una débil reacción frente al virus de la diarrea viral bovina³².

El aislamiento del VFPC a partir de las muestras de sangre desfibrinada y de los tejidos linfoides de los cerdos inoculados con el VFPC (Grupo 1 "A"), permitió obtener una cantidad de partículas virales menor a la inoculada (una disminución de 5 a 150 veces), lo que no coincide con lo reportado por Depner y colaboradores³⁰. Lo anterior es factible que esté asociado al hecho de que los lechones fueron sacrificados el día 8 postinoculación, cuando iba en disminución su temperatura rectal es decir, los lechones al ser sacrificados ya habían pasado por su pico de temperatura febril, que es uno de los momentos en que se ha reportado que existe una mayor concentración de partículas virales en el torrente sanguíneo⁹.

En la literatura revisada se menciona que los cerdos infectados con el VFPC pueden excretar el virus desde el período de incubación. En el caso de la infección con una cepa de virus virulento como la ALD, que se utilizó en este experimento estarán presentes altos niveles de virus en la sangre y tejidos; grandes cantidades de virus se excretarán en los fluidos orales y cantidades más pequeñas en la orina, heces, fluidos lagrimales y nasales. La excreción viral continúa hasta la muerte; o en caso de supervivencia, hasta que se desarrollen anticuerpos^{8,9,14}.

El aislamiento del VFPC a partir de las muestras de sangre desfibrinada y de los tejidos linfoides de los cerdos inhaladores (Grupo 1 "B"), permitió obtener una cantidad de partículas virales ligeramente mayor a la inoculada por vía intramuscular a los cerdos del Grupo 1 "A" con un incremento de dos a tres décimas de logaritmo, lo que coincide con lo informado por Depner y colaboradores³⁰.

La aplicación de la Biología Molecular para clasificar a los pestivirus: el VFPC, el virus de la diarrea viral bovina y el de la enfermedad de la frontera de los ovinos, ha tenido un desarrollo lento^{33,34,36,37,41,42}, ya que desde la década de los años 70's se había dejado de investigar intensivamente la FPC en los campos de patogénesis celular, subcelular y molecular y en el aspecto de biología molecular del VFPC; comparado con los trabajos que se han hecho por ejemplo con los retrovirus, en especial el del VIH del cual para 1985, ya se conocía la secuencia de los nucleótidos del virus aunque los primeros casos de SIDA habían sido reconocidos alrededor de 1980⁴⁸.

A partir de 1989 se retomaron los trabajos sobre el VFPC y otros pestivirus, aplicando herramientas de la Biología Molecular. Se han publicado estudios acerca de la genealogía de los pestivirus⁴¹, incluyendo la secuencia genómica del virus de la enfermedad de la frontera.

Se han publicado estudios acerca de la genealogía de los pestivirus⁴¹, incluyendo la secuencia genómica completa del virus de la Enfermedad de la Frontera⁴¹.

Por otra parte se han publicado estudios efectuados para detectar el VFPC por la técnica de transcriptasa reversa-PCR (RT-PCR)³⁹; y sobre la secuenciación de los nucleótidos y la clonación molecular del genoma del VFPC para conocer y comparar el VFPC y el de la diarrea viral bovina³⁶. Se han publicado asimismo, estudios de mapeo topográfico y funcional de los epitopes del VFPC con anticuerpos monoclonales, con el fin de facilitar el diagnóstico diferencial de las infecciones producidas por pestivirus³⁶. Lowings y colaboradores publicaron un estudio de epidemiología molecular del VFPC efectuado para distinguir el origen de cepas de VFPC causantes de los brotes de FPC ocurridos en Italia de 1985 a 1994³³. Meyers y colaboradores determinaron las secuencias terminales 5' y 3' del ARN genómico del VFPC, a partir de una clona de ADNc con el fin de llevar a cabo estudios de citopatogenicidad⁵¹. Van Rijn y colaboradores, publicaron el hallazgo de la glicoproteína E2 de la envoltura del VFPC, como unidad antigénica estructural capaz de proteger a los cerdos contra un desafío letal de VFPC⁵², lo cual dio origen al desarrollo de vacunas subunitarias contra la FPC, las cuales hasta la fecha no han demostrado ser adecuadas para su

aplicación masiva en explotaciones porcinas tecnificadas o de traspatio tanto de Europa como de México.⁵³

En México, la Dra. Mendoza efectuó estudios para conocer las proteínas del VFPC que podrían ser utilizadas como marcadoras para desarrollar un sistema de diagnóstico que permita diferenciar las infecciones por el virus de campo de la FPC, de los que son reactores positivos a la FPC, por haber sido vacunados con cepas vacunales del VFPC¹⁸.

En relación con este tema, es muy necesario contar con un desarrollo tecnológico que permita hacer epidemiología molecular del VFPC, con el fin de apoyar consistentemente el avance de la Campaña Nacional contra la FPC, ya que este permitiría ejercer una estrecha vigilancia epidemiológica sobre la FPC.

DISCUSION:

Experimento 2.

Efecto de la vacunación con la cepa PAV-250 sobre la transmisión del VFPC por aire contaminado con aerosoles.

Correa y Morilla coinciden en sus informes con respecto a los resultados que se han obtenido en el CENASA^{43,45,46,47} sobre la constatación de todos los lotes de vacuna contra la FPC, producidos con la cepa PAV-250, no se ha detectado transmisión del virus cepa vacunal durante las pruebas de cohabitación para confirmar que los cerdos que conviven con los cerdos vacunados no adquieren protección vacunal.

Correa y colaboradores informaron que la vacuna PAV-250 contra la FPC es completamente inocua y que confiere protección tanto en pruebas de laboratorio como en pruebas de campo⁴⁶. Al poner cerdos susceptibles en contacto permanente con los vacunados, los susceptibles no han desarrollado resistencia puesto que siempre han muerto ante la posterior exposición con virus virulento y que en una de las pruebas realizadas se observó que 2 de los 5 cerdos susceptibles puestos en contacto, desarrollaron títulos inhibidores sumamente bajos (1:4) detectados por la prueba de inhibición de focos fluorescentes; sin embargo estos cerdos también murieron ante la exposición⁴³.

La aplicación de la vacuna contra la FPC elaborada con la cepa PAV 250 con el fin de establecer una sólida inmunidad de hato, ya ha probado su eficacia, pues en 1992 Correa y colaboradores informaron que para dicho año, se habían vacunado aproximadamente veinte millones de cerdos en México, de diferentes edades y sexos y en ningún caso se habían presentado reacciones adversas atribuibles a la vacuna⁴⁶.

Lo antes descrito coincide con los resultados obtenidos en este trabajo con el grupo de cerdos vacunados y desafiados con una cepa patógena del VFPC, los cuales gracias a la vacunación no excretaron el virus virulento de la FPC.

Por lo tanto, se recomienda la utilización de esta vacuna para su aplicación masiva en todos los estados de la República Mexicana que están en fase de erradicación con vacunación y en la fase de control de la FPC, para favorecer una sólida inmunidad de hato de los porcinos que se explotan en dichas zonas

para alcanzar el objetivo de declarar libre de FPC a México, en un período aproximado de dos años después de vacunar a todos los cerdos, pues se ha observado que después de un año y medio de aplicar continuamente esta vacuna en una granja del Estado de México y en granjas porcinas del Estado de Puebla así como en cerdos de traspatio, no se presentaron nuevos casos de FPC en los cerdos vacunados ^{46,50}.

Podría argumentarse que la cantidad de partículas virales que excretaron los cerdos vacunados y desafiados del Grupo 2 "A", probablemente fue insuficiente para contagiar al grupo 2 "B" de cerdos susceptibles, ya que de este último grupo no se aisló ningún virus a partir de las muestras de sangre ni de las vísceras, ni se detectaron anticuerpos en las muestras de suero tomadas durante los días 14 y 30 postexposición. Sin embargo es importante hacer notar que en condiciones experimentales similares, los cerdos del Grupo 1 "A" fueron capaces de transmitir la FPC a los cerdos susceptibles del Grupo 1 "B"

En el grupo 2 "B", es decir el grupo de cerdos receptores de aire contaminado, se observó fluorescencia contra el VFPC en los cortes de las tonsilas. Al tratar de explicar el por que de la fluorescencia observada se puede tomar en cuenta lo siguiente: el conjugado que se utilizó para esta prueba es un conjugado policlonal, que no se sabe si contenga o no anticuerpos contra algún otro agente infeccioso y que además no distingue las cepas atenuadas de las virulentas del VFPC. Es por ello que no se puede distinguir si la fluorescencia observada fue producida por una u otra cepa de virus de FPC o por algún otro agente infeccioso. A este respecto se debe aclarar que el conjugado utilizado para estas pruebas de inmunofluorescencia, se ha visto que tiene una sensibilidad y una especificidad del 98.5% al ser confrontado con la prueba de aislamiento viral del VFPC en cultivo primario de testículo de porcino ²⁸.

El efecto principal que mostró la vacunación con la cepa PAV-250 contra el VFPC, fue el de impedir la transmisión del VFPC de exposición cepa ALD, por la vía aérea.

La afirmación anterior se basa en los resultados siguientes:

Aislamiento negativo del VFPC, a partir de la sangre y de los tejidos de los cerdos susceptibles después de que inhalaban el aire procedente de los cerdos vacunados con la cepa PAV-250 y desafiados con la cepa ALD, así como los resultados negativos de la prueba de inmunoperoxidasa para detección de anticuerpos contra el VFPC.

Sin embargo, es relevante el hecho de que se aisló el VFPC a partir de los líquidos residuales del Grupo 2 "A", aunque el título de este virus era muy reducido $10^{1.2}$ DICC₅₀. Mientras que el VFPC no fue aislado de los líquidos residuales del Grupo 2 "B". Quedaría por aclarar si el virus que se aisló a partir de los líquidos residuales es algún otro agente etiológico antigénicamente similar a los pestivirus u otro tipo de virus.

Se debe resaltar la importancia del aislamiento del VFPC a partir de los líquidos residuales de la cámara donde estuvieron alojados los cerdos que habían sido vacunados y desafiados con virus virulento (Grupo 2 "A"); este hecho posiblemente sea muy significativo, ya que si hubiera sido virus virulento el aislado, lo más probable es que bajo las condiciones en que se desarrolló este experimento, los cerdos susceptibles (Grupo 2 "B"), se hubieran infectado y enfermado. Sin embargo los cerdos susceptibles no se enfermaron de FPC, pero si dieron resultado positivo a la prueba de inmunofluorescencia en las muestras de sus tonsilas, podría pensarse que estos últimos cerdos inhalan virus cepa vacunal de FPC, partículas del virus de la diarrea viral bovina o algún agente etiológico que cruza antigénicamente con los pestivirus. En caso de que así hubiera sido, los cerdos habrían desarrollado anticuerpos detectables por la prueba de IH. Otra posibilidad pudo haber consistido en que el conjugado policlonal empleado podría contener anticuerpos contra otro agente infeccioso presente en los líquidos residuales y en las tonsilas de los lechones del grupo 2 "B".

En estudios futuros sería conveniente efectuar pruebas de inoculación de cerdos susceptibles, para corroborar la virulencia o la atenuación de los agentes detectados por la prueba de IF, así como de electroforesis y de inmunotransferencia, para establecer si este virus aislado a partir de los líquidos residuales y el detectado por la prueba de inmunofluorescencia, corresponde al virus de desafío ALD, o al virus vacunal PAV-250 o se trata de algún otro agente etiológico. Aunque también quedaría por aclarar si el virus que se aisló a partir de los líquidos residuales es algún otro agente etiológico antigénicamente similar a los pestivirus u otro tipo de virus.

Ahora bien, aunque se ha informado por diversos autores que la cepa PAV-250 no es excretada por los cerdos vacunados^{43,45,46}, no se habían hecho pruebas de IF en los cortes de las tonsilas de los cerdos que hubieran convivido con los cerdos vacunados. En el CENASA, las pruebas de cohabitación consisten únicamente en la observación de los cerdos que

conviven con los vacunados y en el análisis de las muestras de suero de los mismos, para verificar que no tengan anticuerpos contra el VFPC; debido a que nunca han enfermado, no se les ha corrido la prueba de IF en las tonsilas, para ver el resultado correspondiente.

Sería conveniente hacer en el futuro próximo, estudios que ayuden a dilucidar si el virus vacunal PAV-250 se excreta en cantidades muy pequeñas, de manera que sólo pueda ser detectado por pruebas de IF efectuadas por personal técnico experto.

Por lo que respecta a la ausencia de anticuerpos contra el VFPC, en los lechones del Grupo "B" se descartó la posibilidad de que su sistema inmune hubiera estado afectado por alguna enfermedad inmunosupresora, como el PRRS ó la enfermedad de Aujeszky, ya que antes de someterlos a la experimentación se confirmó que eran seronegativos a dichas enfermedades.

Y por otra parte el hecho de que los cerdos de los grupos I "A" y I "B" hayan desarrollado anticuerpos contra el VFPC, también confirma la capacidad inmunológica del lote de cerdos utilizado.

Con relación a la maduración del sistema inmune del cerdo lactante se debe tomar en cuenta que las principales células involucradas en la respuesta inmune son los linfocitos y los fagocitos mononucleares. Los linfocitos T comprenden las células T cooperadoras y las supresoras. Estos últimos regulan a los macrófagos y a los linfocitos T y B en la respuesta humoral ⁴³.

Las células T citotóxicas y las T de hipersensibilidad retardada intervienen en la eliminación de los antígenos celulares, tales como las células infectadas por microorganismos intracelulares. Cisneros y colaboradores⁴⁴ afirman que el sistema inmune de los lechones durante las primeras semanas de vida es inmaduro, pues la concentración de los diferentes tipos de células es menor que en los cerdos adultos y es a partir de aproximadamente la octava semana de edad cuando alcanzan los niveles del adulto. Por lo antes expuesto y no obstante que los cerdos utilizados en este experimento tenían 6 semanas de edad, se puede descartar el que la falta de anticuerpos séricos en el grupo 2 "B" se haya debido a inmadurez del sistema inmune.

Haciendo referencia a los cambios histológicos observados en los cortes de los nódulos linfoides, tonsilas y bazos, en los que se observaron diferentes grados desde leve a moderado de atrofia linfoide, dichos cambios coinciden

con los informes de otros autores quienes asimismo, observaron diversos grados de atrofia del tejido linfoide a consecuencia de infección por el VFPC^{8,9}.

Recientemente se demostró que la glicoproteína E^{rns} de la envoltura del VFPC tiene actividad de ribonucleasa y es inmunosupresora.

Específicamente la E^{rns} inhibe fuertemente la síntesis de las proteínas de los linfocitos de diferentes especies, sin causar daño a la membrana celular, lo que sugiere un proceso de apoptosis de los linfocitos; esto último se manifiesta como leucopenia e inmunosupresión. Este efecto, es compartido por otros virus del género Pestivirus⁴⁰.

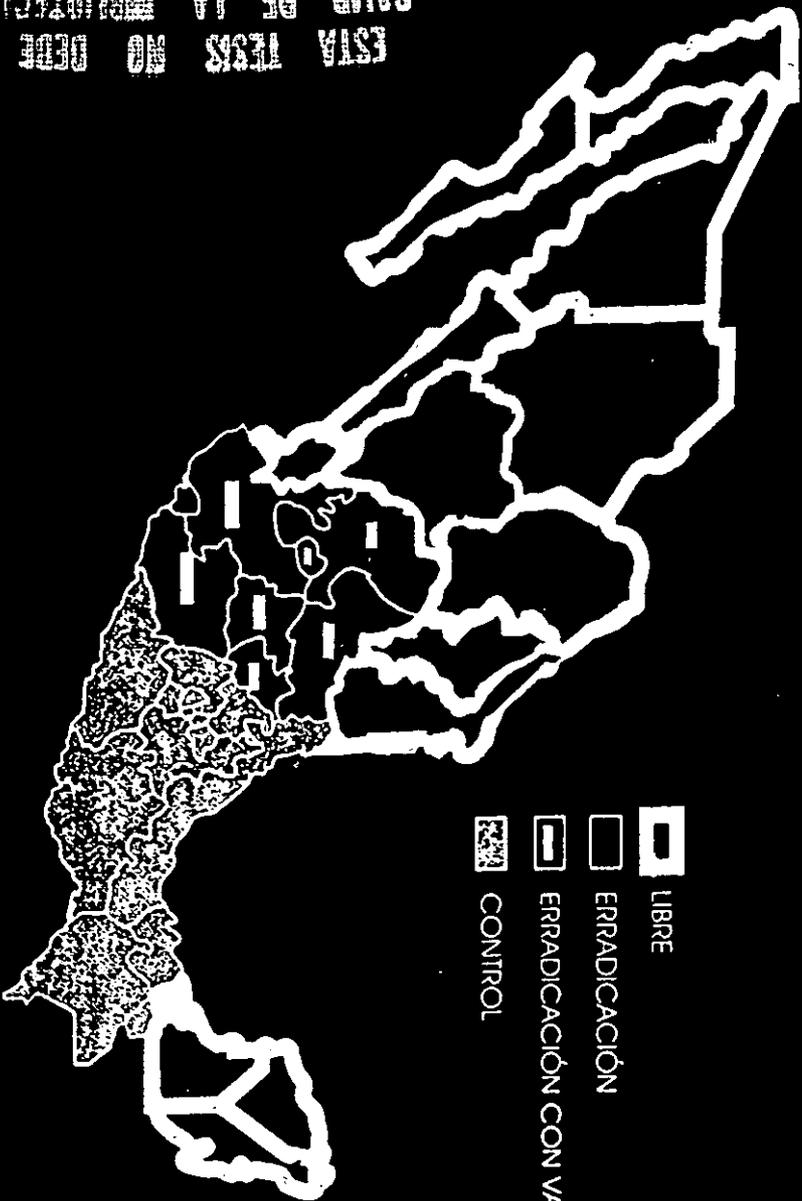
La cambiante forma de presentación de brotes de FPC, como se ha observado en recientes epizootias en Alemania, Holanda y como está sucediendo en los brotes de FPC en los estados de Jalisco, Guanajuato, México y otros, llegando a sumar más de 240 en 1997 y 1998 podría estar relacionada con las características genéticas de los cerdos y no exclusivamente con las propiedades de las cepas del VFPC involucradas, ya que en un estudio efectuado sobre la vigilancia epizootiológica de FPC en zonas en control de la FPC en México, efectuado por el comité de enfermedades infecciosas de los cerdos del CONASA⁴⁹, se informó que aproximadamente la tercera parte de los brotes de FPC que se presentaron en los estados de la zona centro-sur y sur, la presentación de la enfermedad fue de tipo aguda y subaguda. (Figura No. 2). En cuanto al mecanismo de transmisión en ese mismo estudio, numerosos casos (25 %) fueron por contacto directo con cerdos infectados y en el 25 % de los casos se estableció que ocurrieron en granjas porcinas vecinas a las afectadas por lo que existe la posibilidad de que algunos de los brotes antes mencionados podrían haberse debido a la transmisión por la vía aérea del VFPC.

Con base en las características de los brotes de FPC que ocurrieron en la zona centro-occidente durante 1998, la Dirección General de Salud Animal decidió cambiar el estado de esa zona a erradicación con vacunación, con el fin primordial de evitar el libre tránsito de porcinos sus productos y subproductos, de zonas en control hacia la zona en erradicación con vacunación, ya que ello podría provocar que ingresarán cepas del VFPC, que actualmente sólo existen en la zona en control.

Hasta el mes de noviembre de 1999, sólo el estado de Colima, el cual forma parte de la zona centro-occidente conserva el estado de erradicación; los demás estados integrantes de dicha zona pasaron a la fase de erradicación con

vacunación. Sin embargo, esta situación podría ser modificada en un corto plazo si llegara a aislarse el VFPC o se encontraran anticuerpos contra el VFPC en muestras de cerdos de esa entidad federativa⁵⁴.

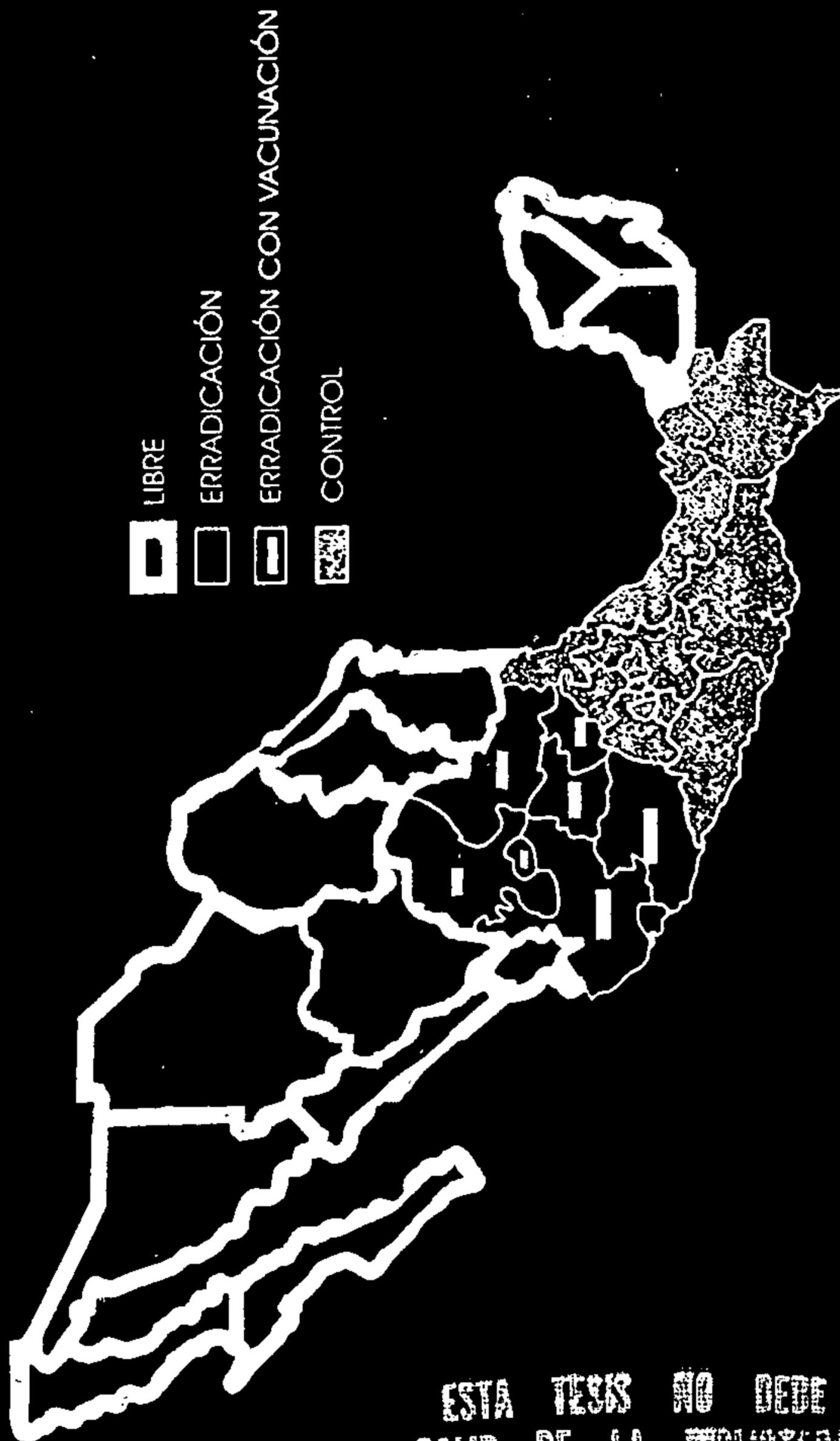
ESTAS TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA



Mapa 2.- Zonificación de la Campaña Nacional
contra la Fiebre Porcina Clásica en México
26 de noviembre de 1999

**Mapa 2.- Zonificación de la Campaña Nacional
contra la Fiebre Porcina Clásica en México**

26 de noviembre de 1999



ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. Mediante el procedimiento descrito se confirmó que el VFPC se transmite por vía aérea, por lo que el virus exhalado por cerdos enfermos de FPC es capaz de infectar a cerdos susceptibles que se encuentren a un metro de distancia.
2. La cepa ALD del VFPC causa la enfermedad de curso agudo con diferentes grados de severidad en los cerdos de la misma edad y del mismo origen.
3. Uno de cada 4 cerdos infectados por la vía respiratoria con la cepa ALD, puede dar un resultado falso negativo en la prueba de inmunofluorescencia para la detección del antígeno del VFPC y en el estudio histológico puede observarse únicamente atrofia del tejido linfoide, aunque el VFPC puede aislarse a partir de muestras de órganos linfoides.
4. Se recomienda que el diagnóstico de laboratorio de FPC debe estar basado en los resultados de la aplicación de dos pruebas, corridas en las mismas muestras, utilizando testigos positivos y negativos y de ser posible, simultáneamente: inmunofluorescencia y aislamiento viral o PCR; inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa en cortes de tejidos congelados; inmunofluorescencia y ELISA para detectar el antígeno del VFPC.
5. Los cerdos que inhalan el aire contaminado producido por cerdos vacunados y desafiados no se enferman de FPC.
6. La vacuna PAV-250 inhibe la replicación del VFPC en los cerdos inoculados con la cepa ALD.
7. Se recomienda la utilización de la vacuna PAV-250 de virus atenuado contra la FPC para su aplicación masiva tanto en granjas tecnificadas como en cerdos de traspato en todos los estados de la República Mexicana que están en fase de erradicación con vacunación y en la fase de control de la FPC, para alcanzar el objetivo de declarar libre de FPC a México en un período aproximado de dos años de aplicación semestral de la vacuna .

Bibliografía:

1. Cuarón I.J. Las enfermedades son un problema de manejo. En: Morilla A., Correa P. y Stephano A., editores. Avances en Enfermedades del Cerdo. México D. F.: Ediciones de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, A. C.: 1985. p 19.
2. Aguilera F. J.L., Ciprián C.A., Cruz T., Lara H y Mendoza S.: editores .Tecnologías de Producción de Cerdos de Alta Salud. En:. XXXI Congreso Nacional AMVEC . Memorias: 1996 Agosto 10-13: Veracruz, México. Cuautitlán Izcalli, México; 1996. p. 19.
3. López J. Transmisión de Enfermedades. En: Fuentes R. M., Pijoán A. C., editores. Clínica Porcina 87/88. México D. F. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia: Universidad Nacional Autónoma de México: 1988.pp.29-35.
4. Wilkinson P.J., Donaldson AI, Greig A, et al . Transmission studies with african swine fever virus. J Comp. Pathol 1997, 87: 487-495.
5. Torremorell M., Pijoan C., Janni K. et al . Airborne transmission of Actinobacillus pleuropneumoniae and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in nursery pigs . AJVR, 1997; 58: 828-832.
6. Schoenbaum MA, Zimmerman JJ, Beran GW, et al. Survival of Pseudorabies virus in aerosol. AJVR, 1990; 51: 331-333.
7. Christensen L.S, Mousing J, Motensen S, et al. Evidence of long distance airborne transmission of Aujeszky's disease (Pseudorabies) virus. Vet Rec 1990; 127: 471-474.
8. Dunne H.W. Hog Cholera. In: Dunne H.W. Editor. Diseases of Swine 2nd Edition. University Press, Ames Iowa, U.S.A. p. 140-185.1964.
9. Van Oirschot J.T. Hog Cholera. In: Leman AD , Glock RD and Mengeling WL. Editors. Diseases of Swine 6th Ed. Ames (Iowa): Iowa State University Press . p 289-299. 1986
10. Hernández B.E. Características del virus de Cólera Porcino. En: Morilla A., Correa P. y Stephano A., editores. Avances en Enfermedades del

- Cerdo, 1985. México D. F.: Ediciones de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, A.C. 1985. p. 67- 69.
11. Blood D.C. and Henderson J.A.: Veterinary Medicine 4th Ed. Bailliere Tindall. London p. 457-463. 1974
 12. Bruner D.W. and Gillespie J.H.: Hagan's Infectious Diseases of Domestic Animals.. 6th Edition. p. 1266-1282. 1973
 13. Correa M.W. y Correa .C.N.M.: Enfermidades Infecciosas dos Mamferos Domésticos. Ed. J.M. Varela, Livros Ltda. Sao Paulo Brasil. 1979. p.681-690
 14. Terpstra C. Epizootiology of Hog Cholera. In: Liess B. Editor. Classical Swine Fever and Related Viral Infections. Boston , U.S.A.: M.Nijhoff Publishing: 1988. p.201-214.
 15. Fields A. Int. Com. Taxonomy of Viruses. World Health Organization. Geneva Switzerland. 1995.
 16. Aguilera F. J.L., Ciprián C.A., Lara H., Mendoza S. y Torres E. editores. Dinámica y Reconocimiento de las proteínas de la FPC en cerdos vacunados y/o desafiados: 1.- Vacunación, desafío y efecto en los cerdos centinelas . En : Memorias del XXXII Congreso Nacional AMVEC: 1997 Agosto 10-13: Ixtapa, México. Cuautitlán Izcalli, México: 1997. p. 83.
 17. Mohanty SB and Dutta SK. Veterinary Virology. 1st ed. Philadelphia PA : Lea & Febiger: 1981.pp. 43, 198-200
 18. Mendoza E.S.E. "Fiebre Porcina Clásica: Investigación Actual y Perspectivas de un Desarrollo Tecnológico Aplicado al Diagnóstico Serológico". Tesis Doctoral. FESC UNAM (México); 1995. PADEP No.: FCU-9121, 9210, 100304, 100303.
 19. Hughes R.W., Gustafson D.P. Some Factors that may Influence Hog Cholera Transmission. Am. J.Vet .Res. 1960. 464-471.
 20. Schwarte L.H. and Mathews J. Aerosol Properties of Lyophilized Hog Cholera Virus. Veterinary Medicine . 1954. 233-234.

21. Beard C.W. and Easterday B.C. Aerosol Transmission of Hog Cholera. Am J. Vet. Res. 1965. 26. 630-636.
22. Kulesko I.I. and Shikov A.T. Testing the efficacy of swine fever vaccines by challenging pigs with aerosols of highly virulent virus. Vet Bull., 1963. 33 .500.
23. Calderón A. N.L., García E. R.M. y Paasch M.L.H. Estudios hematológicos en la fiebre porcina clásica aguda. Aportaciones a la patogénesis de la diátesis hemorrágica. Vet. Méx. 1997; 28 (1): 21-24.
24. Dukes H.H. Fisiología de los Animales Domésticos. 3ª. Ed, Trad. de la 7ª Ed. en inglés. Madrid España: 1969.p.601.
25. Slausson D.O. and Cooper B.J. Mechanisms of disease. Ed. Williams and Wilkins. Baltimore, MD U.S.A.:1982. P 402-403.
26. Cawthorne RJG. Swine Fever in Germany and the Netherlands. Vet Rec.1997;134:187.
27. Murphy D.A., Alstine van W.G., Clark L.K., Albrechts S. and Knox K. Aerosol vaccination of pigs against Mycoplasma hyopneumoniae infection. Am. J. Vet. Res. 1993 ; 54: 1874-80.
28. Macias G.M., Guerrero A., Miranda S.A., González S. C. y Delgadillo A.J.B. Diagnóstico de Fiebre Porcina Clásica (FPC) en microplacas, evidenciado por inmunoperoxidasa. En : Morilla G.A. Editor: Simposium Internacional de Fiebre Porcina Clásica . Memorias: 1998 Puebla, Puebla-Tecamac-México
- 29 . OIE Standards Commission: Editors. Classical swine fever (hog cholera). Diagnostic Techniques Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. Lists A and B diseases of mammals, birds and bees. Third edition. Paris, France: Office International des Epizooties: 1996. p 145-154.
30. Depner K.R., Rodriguez A., Pohlenz J. and Liess B. Persistent classical swine fever virus infection in pigs infected after weaning with a virus isolated during the 1995 epidemic in Germany: Clinical, virological

serological and pathological findings. *European Journal of Vet. Path.* 1996; July 2 :2 :61-66

31. Depner K.R., Hinrichs U., Bickhardt K., Greiser W.I. Pohlenz J. Moeneing V. and Liess B. Influence of breed related factors on the course of classical swine fever virus infection. *Vet Rec* 1997 140 : 506-507
32. Tuero C., Díaz A.H., Vega A., Barrera M. y Frías M.T. Aislamiento e identificación del virus de la Peste Porcina Clásica durante un brote de la enfermedad en Cuba. *Rev. Salud Anim.* 1995 17:241-244.
33. Lowings J.P., Paton D.J., Sands J.J., De Mia G.M. and Rutili D. Classical swine fever : genetic detection and analysis of differences between virus isolates. *J.gen. Virol.* 1994: 75 : 3461-3468
34. Wensvoort G., Boonstra J and Bodzinga B.G. Immunoaffinity purification and characterization of the envelope protein E1 of hog cholera virus. *J. Gen . Virol.* 1990 Vol. 71 . 531.540.
35. Aiken J.M., Hoopes K.H., Rhodes M.B. and Twiehaus M.J. Nonspecificity of Fluorescent-Antibody Test for distinguishing Hog Cholera Virus strains. *J.A.V.M.A.* 1967: 150:1:59-61
36. Meyers G., Rumenapf T. and Thiel H.J. Molecular cloning and Nucleotide sequence of the genome of Hog Cholera Virus. *Virology.* 1989: 171: 555-567.
37. Ishikawa K., Nagai H., Katayama K. , Tsutsui M. , Tanabayashi, K., Takeuchi K., Hishiyama M., Saitoh A. , Takagi M., Gotoh K. , Muramatsu M. , and Yamada A. Comparison of the entire nucleotide and deduced amino acid sequences of the attenuated hog cholera vaccine strain GPE and the wild-type parental strain ALD. *Arch. Virol.* 1995: 140: 1385-1391
38. Coba A. M.A. y Correa G.P. Diagnóstico de Fiebre Porcina Clásica (FPC) por la técnica directa de inmunofluorescencia. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. INIFAP.CENID M. México: 1993.
39. Harding M., Lutze-Wallace C., Prud'homme I., Zhong X., And Rola J. Reverse transcriptase-pcr assay for detection of hog cholera virus. *J. Clin Microbiol.* 1994: 32:10: 2601-2602.

40. Brusckke C.J., Hulst M.M. Moorman R.J. , Rijn P.A. and Oirschot J.T. Glycoprotein Erns of pestiviruses induces apoptosis in lymphocytes of several species. *J. Virol.*, Sept.1997: 71:9: 6692-6696,
41. Becher P. , Orlich M. , and Thiel H.J. Complete Genomic Sequence of Border Disease Virus, a Pestivirus from Sheep. *J Virol*, June 1998: 72: 6: 5165-5173.
42. Paton D.J. Pestivirus diversity . *J. Comp. Path.* 1995: 112: 215-236.
43. Correa G.P. Experiencias con los biológicos contra el cólera porcino. En: Morilla A., Correa P. y Stephano A., editores. *Avances en Enfermedades del Cerdo*, 1985. México D. F.: Ediciones de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, A.C. 1985. p. 117-124.
44. Cisneros I. y González V. D. Maduración del sistema inmune del cerdo lactante. En: Morilla A., Correa P. y Stephano A., editores. *Avances en Enfermedades del Cerdo*, 1985. México D. F.: Ediciones de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, A.C. 1985. P. 51-52.
45. Morilla G.A. Conceptos sobre la inmunización contra el cólera porcino en México. En: Moreno Ch. R., editor. *Ciencia Veterinaria Vol. 5*. México D.F.. Universidad Nacional Autónoma de México, 1991. p.119-139.
46. Correa G.P., Coba A. M.A. y Anaya E.A.M.: Investigaciones realizadas en México con la vacuna PAV-250 de virus vivo atenuado contra la fiebre porcina clásica (FPC). *Academia Veterinaria Mexicana, A.C.* 1992.
47. Comisión Nacional de Sanidad Agropecuaria, Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal, CENASA. Folleto conmemorativo del 25 Aniversario. México D.F. Marzo de 1999.
48. Garret L. The coming plague. Newly emerging diseases in a world out of balance. 1st ed. New York (N.Y.) Penguin Books USA Inc. 1995.p.658.
49. Rosales O.C. Vigilancia Epizootológica de Fiebre Porcina Clásica en zonas en Control. Memoria de la 6^a Reunión Anual del CONASA. Comisión Nacional de Sanidad Agropecuaria. México 1997. Pp 83-104.

50. Correa G.P.: Características más importantes de la vacuna PAV-250 y de las vacunas contra la Fiebre Porcina Clásica usadas en México . En : Morilla G.A. editor. Memorias del Simposium Internacional de Fiebre Porcina Clásica. 1998. Puebla, Puebla. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, IICA y el Comité para el Fomento y la Protección Pecuaria del Estado de Puebla, S.C. México D.F.1999.
51. Meyers G., Heinz-Jurgen T. and Rümenapf T. : Classical Swine Fever Virus: Recovery of infectious viruses from cDNA Constructs and Generation of Recombinant citopathogenic Defective Interfering particles. J.of Virology, Mar. 1996. vol. 70, no. 3 pp 1588-1595.
52. Van Rijn, Bossers A. and Moorman R.J.M.: Classical Swine Fever Virus (CSFV) envelope glycoprotein E2 containing one structural antigenic unit protects pigs from lethal CSFV challenge. Journal of General Virology. 1996. Vol. 77 pp. 2737-2745.
53. Comisión Nacional de Sanidad Agropecuaria, Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal, CENASA. Informes de resultados de los experimentos efectuados para determinar la eficacia de vacunas subunitarias contra la FPC. Tecamac, Estado de México. 1999.
54. Comisión Nacional de Sanidad Agropecuaria: Operativo para el Control y Erradicación de la Fiebre Porcina Clásica. México D.F. México. Octubre de 1999.