

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL**

**“DINÁMICA DE LA INFECCIÓN EN CERDOS VACUNADOS CON
EL VIRUS DE FIEBRE PORCINA CLÁSICA Y DESAFIADOS CON
EL VIRUS DEL SÍNDROME RESPIRATORIO REPRODUCTIVO
PORCINO”**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

ANGEL LOZADA DE GANTE

TUTOR: DR. ABEL CIPRIÁN CARRASCO

**COMITÉ TUTORAL:
DR. SUSANA MENDOZA ELVIRA
MVZ, MA. PABLO CORREA GIRÓN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO

DRA MARIA ELENA TRUJILLO ORTEGA

DR. ABEL CIPRIÁN CARRAZCO

DR. HUMBERTO RAMIREZ MENDOZA

DRA. SUSANA MENDOZA ELVIRA

MVZ, MA. PABLO CORREA GIRÓN

EN EL CAMINO A LA SABIDURÍA, EL PRIMER PASO ES SILENCIO; EL SEGUNDO, ESCUCHAR; EL TERCERO, RECORDAR; EL CUARTO, PRACTICAR; EL QUINTO, ENSEÑAR A OTROS.

SALOMÓN IBN GABIROL

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto de investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Virología de la Secretaría de Posgrado de la FES-C de la UNAM, bajo la asesoría del Dr Abel Ciprián Carrasco y de la Dra Susana E. Mendoza Elvira, con apoyo del proyecto “Afecciones bacterianas y Virales del Cerdo” (PACIVE CON 112) y en la instalaciones del laboratorio de virología del CENID Microbiología, INIFAP, bajo la asesoría del MA Pablo Correa Girón.

AGRADEZCO:

A DIOS POR DARMER LA VIDA, LA SALUD, LAS FUERZAS, LA CONSTANCIA, LA DEDICACIÓN, LA INTELIGENCIA Y LA OPORTUNIDAD DE REALIZAR MI DOCTORADO.

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO QUE COMO INSTITUCIÓN ME PERMITIO SEGUIR MIS ESTUDIOS DE POSGRADO CURSANDO EL DOCTORADO, EN LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN, GRACIAS.

A EL DR. ABEL CIPRIÁN CARRAZCO MI TUTOR PRINCIPAL HOMBRE HUMANISTA, Y DE GRAN CONOCIMIENTO CIENTIFICO, LE AGRADEZCO SUS CONSEJOS E INDICACIONES PARA QUE ESTE PROYECTO CIENTIFICO CULMINARA EN MI DOCTORADO.

A LA DRA. SUSANA MENDOZA ELVIRA, MI SEGUNDO TUTOR, GRACIAS POR SUS CONSEJOS, ORIENTACIÓN Y APORTACIONES, PARA EL DESARROLLO DE MI DOCTORADO, GRACIAS DE TODO CORAZÓN.

A MI JURADO PROFESIONAL DRA MARIA ELENA TRUJILLO ORTEGA, DR. ABEL CIPRIÁN CARRAZCO, DR. HUMBERTO RAMIREZ MENDOZA, DRA. SUSANA MENDOZA ELVIRA Y MVZ, MA. PABLO CORREA GIRÓN
LES DOY GRACIAS POR SUS APORTACIONES Y RECOMENDACIONES EN ÉSTA TESIS DOCTORAL

Al MVZ y M C. HORACIO LARA PUENTE POR SUS VALIOSAS CONSEJOS Y RECOMENDACIONES AL IGUAL DEL APOYO TÉCNICO CIENTIFICO DE ESTE PROYECTO GRACIAS DIOS LO BENDIGA

A TODOS LOS DOCTORES Y MAESTROS QUE ME FORMARON EN ESTA INSTITUCIÓN CON SUS CONSEJOS Y APOYOS Y EN LOS LABORATORIOS, GRACIAS; MVZ DAVID TRUJILLO, DR. ELISEO HERNÁNDEZ BAUMGARTEN DR. ANDRES ROMERO ROJAS GRACIAS POR SUS APORTACIONES CIENTIFICAS Y TECNICAS.

A LA MVZ y M C A. ROMERO DÍAZ POR SUS APORTACIONES, CONSEJOS Y APOYO EN LA EJECUCIÓN DE ESTE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN GRACIAS POR TODO.

AL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES, AGRICOLAS Y PECUARIAS (INIFAP) GRACIAS, Y EN ESPECIAL A EL PERSONAL CIENTIFICO Y TÉCNICO DEL LABORATORIO DE VIROLOGÍA BAJO LA DIRECCIÓN DEL MVZ, M.A. PABLO CORREA GIRÓN Y SUS COLABORADORES; M.C. MARIA ANTONIA COBA AYALA, MVZ LAURA ZAPATA SALINAS, M.C. GUADALUPE SOCCI ESCATEL, MVZ ENRIQUE CHAVEZ CASTAÑEDA, TECNICOS ESTEBAN G. G. Y SR. MARTIN CRUZ S. GRACIAS A TODOS POR SU VALIOSO APOYO PARA LA EJECUCIÓN PRÁCTICA DE ÉSTE PROYECTO.

A EL ING. JUAN R. GARIBAY BERMÚDEZ POR SUS APORTACIONES Y ASESORÍA EN LA ESTADISTICA DE ESTE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN GRACIAS

INDICE

Resumen	1
Abstract	3
1.0 Introducciòn	4
1.1 Antecedentes	6
1.1.1 Fiebre Porcina Clásica (FPC)	6
1.2 Características del virus de la Fiebre Porcina Clásica	7
1.2.1 Agente Etiológico	7
1.3 Patogenia	8
1.3.1 Fase aguda de Fiebre Porcina Clásica	9
1.3.2 Infección persistente	9
1.4 Signos clínicos	10
1.5 Lesiones de Fiebre Porcina Clásica	11
1.5.1 Lesiones por òrgano	12
1.6 Vacunaciòn con Fiebre Porcina Clásica	13
1.7 Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS)	13
1.7.1.Etiología	13
1.7.2 Epidemiología	14
1.8 Transmisiòn	14
1.9 Patogenia	15
1.10 Signos Clínicos	16
1.11 Lesiones	17
1.12 Sistema inmune del cerdo	17
1.12.1 Componentes del sistema inmune	17
1.12.2 Células del sistema inmune del cerdo	18
1.12.3 Citocinas	20
1.12.4 El sistema inmune frente a los virus	21
1.12.5 Respuesta natural frente a los virus	22
1.12.6 Respuesta adquirida frente a los virus	23
2.0 Justificaciòn	24
3.0 Hipòtesis	25
4.0 Objetivo general	26
4.1 Objetivos particulares	26
5.0 Material y Métodos	27
5.1 Cultivo y cosecha de células	27
5.2 Conteo de las células	28
5.3 Título de virus patògeno	28
5.4 Animales	29
5.5 Inoculaciòn de lechones	29
5.6 Diseño experimental	30
5.7 Parámetros a evaluar	32

5.7.1 Evaluación clínica	
5.7.2 registro de la temperatura	32
5.7.3 Serología	32
5.7.4 Cuenta total de leucocitos	33
5.7.5 Prueba de RT – PCR	33
5.7.6 Lesiones macroscópicas	33
5.8 Análisis estadístico	33
6.0 Resultados	34
6.1 Signos clínicos	34
6.2 Registro de la temperatura	36
6.3 Evaluación de leucocitos	37
6.4 Evaluación de las lesiones macroscópicas	40
6.5 Evaluación de serología mediante ELISA	42
6.6 Determinación del virus de FPC y PRRS mediante PCR	44
7.0 Discusión	45
7.1 Signos clínicos	45
7.2 Evaluación de leucocitos	46
7.3 Identificación viral mediante RT – PCR	47
7.4 Perfil de anticuerpos contra la FPC mediante ELISA	47
8.0 Conclusiones	49
9.0 Bibliografía	51
10.0 Anexos	57
10.1 Descripción de las pruebas de diagnóstico	57
10.1.1 ELISA de captura	57
10.1.2 ELISA competitiva	59
10.1.3 Técnica de RT-PCR	62
10.1.4 Electroforesis	63
10.1.5 Graficas	65
11.0 Abreviaturas	68

Resumen

Se analizó la dinámica de la infección en cerdos desafiados con el virus patógeno del síndrome respiratorio reproductivo porcino (PRRS), y vacunados con el virus vacunal contra la fiebre porcina clásica (FPC) cepa PAV-250, con el objetivo de conocer si esta vacuna viva atenuada contra la FPC interacciona como un factor desencadenante en la patogénesis, presentación y permanencia de la enfermedad producida por el virus del PRRS.

En el diseño experimental se formaron ocho grupos y fueron asignados 5 lechones a cada grupo, en forma aleatoria, los cuales tenían 21 días de edad; el día de la inoculación y del desafío con virus patógeno del PRRS fue considerado como el día cero y los tratamientos fueron los siguientes. El Grupo 1 control negativo; Grupo 2 inoculado con virus del PRRS el día cero; Grupo 3, inoculado con el virus vacunal de FPC el día cero; Grupo 4, inoculado con el virus vacunal de FPC y desafiado con el virus patógeno de PRRS el día cero; Grupo 5, se vacunó con la cepa PAV-250 del virus de la FPC siete días antes del desafío, considerado como día menos siete y al día cero se aplicó la dosis de virus patógeno del PRRS; Grupo 6, el día menos 7 se inoculó el virus patógeno del PRRS, y el día cero se vacunó con la cepa PAV-250, de la FPC; Grupo 7, en el día menos 14 se vacunó con la cepa PAV-250 de la FPC y el día cero se inoculó con el virus del PRRS; y el Grupo 8, se inoculó con el virus del PRRS el día menos 14 y el día cero se aplicó la vacunación con la cepa PAV-250 contra la FPC. El día 30 se evaluó la protección de la vacuna contra la FPC, desafiando a los lechones de todo el experimento con la cepa virulenta AMES de la FPC. Se evaluaron los signos clínicos, la cuenta total de glóbulos blancos, mediante la técnica de biometría hemática; el perfil de anticuerpos, contra el virus de la FPC, con la técnica de ELISA; y la identificación de los ácidos nucleicos virales mediante RT-PCR anidada. Los grupos 6, y 8, presentaron un aumento de signos clínicos después de vacunados con la cepa PAV-250 de la FPC, y los grupos 5 y 7, no presentaron signos clínicos aparentes ($p < 0.005$); la temperatura corporal posinoculación con el virus del PRRS aumentó 1.5°C en promedio, durante 5 días, posteriormente se normalizó ($p > 0.005$). Los grupos 5 y 7 presentaron una ligera leucopenia (10,075 y 8,870 leucocitos/ mm^3 respectivamente) posvacunación con la cepa PAV-250 y una leucocitosis (25,100 y 20,510

leucocitos/mm³ respectivamente) posinoculación con el virus de PRRS, y en los grupos 6 y 8 se detectó una baja ligera de leucocitos (12,600 y 9,400 leucocitos/mm³ respectivamente) posvacunación con la cepa PAV-250 contra la FPC y posinoculación con el virus del PRRS, ($p < 0.005$). Respecto al perfil de anticuerpos contra FPC, en los grupos 5 y 7 se detectaron anticuerpos vacunales contra la FPC en el 80% a 86%, respectivamente, los grupos 6 y 8 tuvieron en promedio un 62% y 60% respectivamente ($p < 0.001$). Al desafiar a los lechones con la cepa virulenta Ames de la FPC el día 30 se mantuvieron constantes los porcentajes de anticuerpos antes mencionados de los grupos 5, 7, 6 y 8. Estos resultados demuestran que la infección con el virus del PRRS en lechones SPF, antes de la vacunación con la cepa PAV-250 contra la FPC, se presentó una respuesta sinérgica, agravando el cuadro clínico, pero no afectó la respuesta de anticuerpos estimulada por la cepa vacunal y al desafiarlos con una cepa virulenta de FPC no presentaron morbilidad ni mortalidad. Y en lechones sin vacunación contra la FPC e infectados con VPRRS al desafiarlos con la cepa virulenta de la FPC se potencializaron los cambios clínico patológicos de la FPC y hubo una mortalidad del 100%. Y con el objetivo de evaluar las lesiones pulmonares mediante la técnica de planimetría se procedió a realizar la necropsia a toda la mortalidad de los cerdos desafiados con la cepa virulenta de FPC, aplicada el día 30, hasta el día 52 cuando terminó el experimento ($p < 0.001$). Para determinar la significancia estadística en valores continuos, los resultados se evaluaron mediante la prueba estadística, de análisis de varianza (ANOVA) y las medias de los grupos fueron evaluadas a través del método de comparación de medias Least-Significant-Differences (LSD) para establecer diferencias significativas. Para este procedimiento se utilizó el programa computacional SPSS.

ABSTRACT

In 2006, a study was carried out to determine whether the attenuated live virus vaccine PAV-250 against classical swine fever (CSF) interacts as a triggering factor in the presentation, pathogenesis and course of the disease caused by the virulent virus of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). Eight groups (G) were formed and 5 SPF piglets were randomly allocated to each group: G1, negative control; G2, positive control inoculated with PRRSv; G3, vaccinated with PAV-250; G4, vaccinated with PAV-250 and inoculated with PRRSv on day 0; G7 and G5, vaccinated with PAV-250 on days -14 and -7, respectively, and inoculated with PRRSv on day 0; G8 and G6, inoculated with PRRSv on days -14 and -7, respectively, and vaccinated with PAV-250 on day 0. Clinical signs, total white blood cell count by the blood count technique, antibody profile against CSF virus with the ELISA technique, and identification of viral nucleic acids by nested RT-PCR were evaluated. Groups 6 and 8 showed an increase in clinical signs, and groups 5 and 7 did not show apparent clinical signs; body temperature following inoculation increased by 1.5°C on average during 5 days, and it subsequently returned to normal ($p>0.005$). Groups 5 and 7 showed post-vaccination leukopenia and post-inoculation leukocytosis, and post-vaccination and post-inoculation leukopenia was detected in groups 6 and 8 ($p<0.005$). In the antibody profile against CSF in groups 5 and 7, antibody rates of 80% and 86%, respectively, were detected; groups 6 and 8 had mean antibody rates of 62% and 60%, respectively ($p<0.001$). When challenged with CSF virulent Ames strain, these percentages remained constant. Pigs previously vaccinated with the PAV-250 strain did not show clinical and pathological changes when they were infected with the PRRS virus, however, in pigs not vaccinated against CSF and infected with PRRS virus and subsequently with CSF pathogenic virus, the disease worsened, with a 100% mortality rate.

Keywords: CSF, vaccination, PAV-250, PRRSv.

1.0 Introducción

La producción animal es evaluada a través de su eficiencia productiva, la cual puede verse seriamente disminuida cuando existe un problema de salud en los mismos. En particular, en la ganadería porcina, las enfermedades respiratorias tienen una vital importancia debido a las pérdidas económicas que presentan. Dentro de los problemas respiratorios en cerdos, intervienen principalmente bacterias, virus, parásitos y hongos, por lo que se ha denominado como complejo respiratorio porcino (Segales, 2000; Iglesias y Trujano, 2000).

Se ha demostrado que existe asociación entre los agentes etiológicos y se reportan interacciones de virus con virus, virus con bacterias, micoplasmas con bacterias y bacterias con bacterias (Iglesias y Trujano, 2000; Ciprián y Mendoza, 2001).

Actualmente se sabe de la asociación de los virus como es el caso del virus de la fiebre porcina clásica con el virus del síndrome respiratorio porcino ambos afectan fuertemente la producción porcina y la economía de los porcicultores a nivel nacional y mundial (Molina y Medina, 1998).

La FPC es una enfermedad que afecta a los cerdos provocando severos daños con presentaciones clínicas que ocasionan pérdidas de producción, y alta mortalidad en lechones en crecimiento cursando con lesiones de tipo necróticas, inflamatorias y circulatorias (Van Oirschot, 1992; Ramírez y Reynoso, 1995).

El PRRS se conoce como una enfermedad de reciente aparición, se caracteriza por afectar la reproducción de las cerdas, aumentar la mortalidad durante la lactación y provocar neumonía en cerdos de engorda. Es un virus altamente infeccioso, se replica dentro de las células de la línea monocito/macrófago y el pulmón es un sitio predominante de multiplicación vírica (macrófagos alveolares). También se puede multiplicar en celular endoteliales y en los espermatozoides (Fraile, 2004). El ciclo de replicación viral es rápido y la infección produce una lisis celular con la inducción de apoptosis en las células adyacentes (Benfield et al., 1999)

El virus del PRRS ha surgido como un serio problema de salud en muchas regiones de cría de porcinos en el mundo.

En México se detectaron anticuerpos contra el VPRRS en 1994 (Correa et al., 1994) tanto en cerdos nativos como en cerdos importados de Estados Unidos, actualmente la

enfermedad afecta al 80 % de las piaras porcinas y el 60 % de cerdos en traspatio (SAGARPA, 2001). Es un virus que interactúa con otros agentes etiológicos, entre los que se han reportado micoplasmas como el *Mycoplasma hyopneumoniae*; bacterias como *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, también puede interactuar con algunos virus como el de FPC, enfermedad de Aujeszky, paramixovirus porcino, parvovirus porcino, y circovirus porcino. Al interactuar con estos agentes ocasiona grandes pérdidas económicas porque aumenta el porcentaje de morbilidad y mortalidad, así como la presencia de severos signos respiratorios en cerdos de crecimiento a la engorda, con baja conversión alimenticia. Esto provoca que los cerdos afectados salgan con mayor tiempo al mercado; en las hembras de cría se presentan diversos trastornos reproductivos. Para controlar esta enfermedad en la mayoría de las granjas del país se han aplicado diversos mecanismos de bioseguridad, no obstante, estas medidas no presentan el resultado esperado y este virus continúa siendo un problema en cuanto a su control, esto provoca grandes pérdidas en la porcicultura tecnificada y en menor grado en la porcicultura de traspatio (Palomo, 2006).

Asimismo en México para el control de la FPC y para su erradicación, fue establecida una campaña nacional, regida por la Norma Oficial Mexicana NOM-037-ZOO-1995, donde su base principal fue la vacunación utilizando la cepa PAV-250, en zonas de control o erradicación con vacunación, siguiendo la cuarentena y el sacrificio de los cerdos infectados en los brotes ubicados en la zona de erradicación. (Morilla, 1997)

La campaña nacional de control y erradicación es importante porque indica los manejos correctivos cuando se presenta esta enfermedad mediante brotes o focos, principalmente en la porcicultura de traspatio y así afectando a las piaras que se localicen en un radio promedio de 2 Km, lo cual provoca grandes pérdidas económicas. Debido a que afecta la producción porcina por su alta morbilidad y mortalidad, y/o asociación con otros agentes infecciosos, presentándose retraso en el crecimiento y mala conversión alimenticia de animales en crecimiento y desarrollo (Lozada y Morilla, 2002).

Actualmente el país se encuentra en la fase libre de la fiebre porcina clásica mediante la ejecución de la Campaña Nacional contra la FPC.

Por otro lado existen antecedentes de la potencialización de la neumonía en cerdos de crecimiento, bajo la presencia del virus del PRRS y cuando se aplica la bacterina de

Mycoplasma hyopneumoniae, dando como resultado una posible falla vacunal (Thacker y Albur, 1999)

Así mismo se tienen antecedentes reportados en un estudio de 5 granjas de La Piedad, Michoacán, de las manifestaciones clínicas de tipo respiratorio cuando se vacunaron con la cepa PAV-250 en lechones de 30 a 40 días de edad (Pineda *et al.*, 2002), se piensa que podría suceder algo parecido con la aplicación de la vacuna de FPC en presencia del virus PRRS en las granjas afectadas y así mismo se podría presentar una falla vacunal (Lozada y Morilla, 2002).

Estas presentaciones clínicas que se observan en los cerdos de las piaras afectadas, provocan un fuerte impacto en la producción, y economía de los productores, y se podrían presentar brotes de la enfermedad de FPC, debido a una deficiente protección inmunológica de las piaras o una inmunidad muy baja de anticuerpos en las piaras.

En base a lo anterior se considera necesario realizar un estudio para saber qué sucede cuando los cerdos son vacunados con la cepa PAV-250 y en los días siguientes se presentan casos clínicos sugestivos de la enfermedad producida por el virus del PRRS. Así mismo es necesario conocer cómo se presentan los daños que provoca el virus del PRRS a nivel celular y la respuesta inmunológica para conocer la dinámica de la infección del virus del PRRS y su interacción con la vacuna contra el virus de la FPC, mediante un diseño experimental con lechones y la aplicación de técnicas de Biología Molecular, como son la RT-PCR y ELISA.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Fiebre Porcina Clásica

El virus de la FPC apareció en la década de 1830 en los Estados Unidos, donde provocó grandes pérdidas económicas con una amplia difusión y elevada mortalidad.

Fue introducida, a México en 1876 por la importación de cerdos infectados de Estados Unidos, siendo éste un factor que ha contribuido a limitar el desarrollo de la porcicultura nacional. A partir de 1980 se establece la Campaña Nacional, con base en zonas de control, erradicación y zona libre, también se contempló la zona de erradicación con vacunación (Estrada *et al.*, 1998).

Durante la década de 1990, se logran avances favorables de la campaña, declarándose libre de la enfermedad el 61.8% del territorio nacional, que involucra el 27% de la población porcícola y al 32% de la producción de carne de cerdo. Sin embargo,

surgieron brotes de la enfermedad, y un control reglamentario que implica el sacrificio de la piara afectada y la restricción del movimiento de cerdos y sus productos de las regiones afectadas a las zonas libres. En los casos de cerdos afectados estos han sido sacrificados mediante la participación del Dispositivo Nacional de Emergencia de Sanidad Animal, que por sus siglas se reconoce como DINESA (SAGARPA, 2001).

1.2 Características del virus de la Fiebre Porcina Clásica

1.2.1 Agente Etiológico.

El virus de la FPC, anteriormente conocido con el nombre de virus del cólera porcino, se encuentra clasificado como un Flavivirus de tipo ARN, el cual pertenece a la familia Flaviviridae del género Pestivirus. Es un virus esférico y envuelto con una membrana de lípidos, que mide de 40 a 50 nm, contiene una nucleocápside de aproximadamente 29 nm. Posee dos glicoproteínas de 55,000 y 46,000 daltons localizadas en la envoltura viral y una proteína en el nucleocápside de 36,000 daltons (Carbrey, 1986; Van Oirschot, 1992).

Es estable a un pH de 5 a 10 y puede sobrevivir a -20°C hasta por 10 años. También resiste un pH ácido de 4.8 a 5.1 y a temperatura ambiente se mantiene por varios días, pero se inactiva a 60°C por un período de 10 a 15 minutos; también se inactiva en presencia del fenol al 5%, formalina al 2%, Na OH al 4% y con cloroformo, éter o detergentes (Morilla, 1997).

El virus de la FPC se caracteriza por la existencia de dos biotipos, los no citopatogénicos y los citopatogénicos; de ellos, los primeros producen una infección persistente, sin manifestación clínica, lo que representa un riesgo pues está presente el virus en la granja sin ser detectado (Correa, 1981; Kosmidou et al., 1998).

El virus puede replicarse en células y leucocitos de la médula ósea roja, bazo y riñón y a nivel de cultivos crece en células de riñón de bovino, ovino, caprino, venado, conejo y cerdo. En estas últimas el virus no produce efecto citopático. El virus de FPC suele replicarse en varias especies de animales domésticos, o silvestres pero no les ocasiona daño. Se ha reportado la presencia de anticuerpos en rumiantes, conejos, felinos, monos y ratones lactantes (Correa, 1981; Carbrey, 1986; Kim *et al.*, 1998).

En el caso particular del virus de FPC, han sido aislados dos biotipos citopatogénicos, el cpMUP1 y el cpBW1 de muestras obtenidas durante un brote de FPC en Alemania (Kosmidou, 1998).

Lechones destetados (40 días de edad) inoculados con cpBW1, manifestaron un cuadro clínico y lesiones macroscópicas características de FPC; mientras que en los adultos, no hubo esta manifestación. La viremia se inició desde el día 3 y permaneció hasta los días 10 a 13. (Kosmidou, 1998; Widjoatmodjo *et al.*, 1999).

Las cepas de alta virulencia producen una enfermedad aguda acompañada de elevada mortalidad, las cepas de moderada virulencia presentan cuadros hiperagudos o crónicos y las cepas de baja virulencia ocasionan una presentación subclínica en los fetos, y en los lechones recién nacidos producen mortalidad, pero en los cerdos de crecimiento produce cuadros de mala conversión alimenticia y retraso en el tiempo de engorda para salir al mercado, algunos presentan manifestaciones nerviosas, trastornos circulatorios y muerte, se observan variaciones clínicas después de uno o más pases en cerdos (Carbrey, 1986; Van Oirschot, 1992).

1.3 Patogenia

La vía de entrada del virus en el cerdo puede ser la nasal o la oral pero también se puede infectar por las mucosas de la conjuntiva o la genital, y en forma percutánea por lesiones en piel. El virus se replica inicialmente en células de las tonsilas y de aquí se disemina por vía linfática hacia nódulos linfáticos, donde se vuelve a replicar y posteriormente circula en la sangre periférica, para llegar a diferentes órganos como son: el bazo, nódulos linfáticos viscerales y el intestino. Este proceso patogénico ocasiona que los cerdos

infectados presenten un nivel alto de viremia, lo que provoca leucopenia y trombocitopenia, y esto desencadena una inmunosupresión, situación que favorece la infección con agentes secundarios bacterianos y virales (Correa, 1981; Ramírez y Reynoso, 1995).

Una vez que se desarrolla la viremia en un período aproximadamente de 48 horas, el virus se difunde a la médula ósea, timo, bazo, hígado y nódulos linfáticos (Mendoza *et al.*, 1995). Cuando la infección es por vía genital, por lo regular con cepas de baja virulencia, el virus atraviesa la placenta e infectan los fetos dañándolos drásticamente; si el tiempo de gestación es avanzado en un 50 %, los fetos desarrollan anticuerpos específicos, no maternos, si algunos fetos se infectan en el primer tercio y terminan la gestación completa, presentarán un estado de tolerancia inmunológica, donde el virus es capaz de multiplicarse por períodos largos y en el lechón no se desarrolla inmunidad

protectora. Estos se convierten en portadores sanos, manteniendo por casi toda la vida niveles altos de viremia, que puede ser transitoria después de la ingestión de anticuerpos calostrales (Mendoza *et al.*, 1995; Morilla, 1997).

1.3.1 Fase aguda en la fiebre porcina clásica

Durante la infección por el virus de FPC se presentan 3 fases, la linfática, virémica y visceral, inicialmente la replicación viral se lleva a cabo en las tonsilas consideradas como el primer órgano blanco; posteriormente el virus es movilizado por vía linfática, mediante la circulación que drena las tonsilas, hacia los capilares sanguíneos. Entonces se incrementa la viremia y posteriormente al llegar al bazo el virus es fagocitado para replicarse, de aquí viaja por la sangre periférica (órgano blanco secundario) donde aumenta la replicación y la viremia, provocando una diseminación hacia tejidos del sistema inmune, en los nódulos linfáticos viscerales y estructuras linfoides del sistema digestivo y médula ósea (Mendoza *et al.*, 1995).

De esta forma el virus se replica en las células reticulares, endoteliales y epiteliales, en estas últimas la infección es mediada por células del sistema retículo-endotelial y depende de la virulencia del virus ó del tipo de cepa para que se presente la viremia, y en las cepas de alta virulencia es de 4 - 6 días (Mendoza *et al.*, 1995).

La presentación aguda de la FPC desarrolla severa trombocitopenia, desordenes en la síntesis de fibrinógeno y degeneración de células endoteliales, todo esto ocasiona múltiples hemorragias en los órganos internos, tejidos y piel (Ramírez y Reynoso, 1995). Una vez establecida la enfermedad, después de 72 horas, se presentan signos clínicos tales como aumento de temperatura corporal de hasta 42 °C, leucopenia de 9,000 a 3,000 glóbulos blancos por mm³, así también hay trombocitopenia (50 a 20 mil por mm³), posteriormente debido a la inmunodepresión, se infecta el lechón con agentes secundarios provocando un aumento del número de glóbulos blancos y de plaquetas (Correa, 1981).

1.3.2 Infección persistente

Cuando la infección persiste debido a la presencia de virus de campo de baja o moderada virulencia, el antígeno viral se limita a las células epiteliales de las tonsilas, ileum, glándulas salivales, nódulos peribronquiales y riñón. En esta presentación el virus tiende a desaparecer temporalmente del suero sanguíneo y probablemente sea por

la formación de anticuerpos específicos y/o a la destrucción de las células infectadas por el virus.(Terpstra, 1992; Morilla, 1997)

Los cerdos pueden desarrollar una presentación crónica donde mostrarán una viremia de vida larga, y el virus es diseminado al tejido epitelial, linfóide y al del sistema retículo-endotelial, los cerdos no producen anticuerpos neutralizantes en contra del VFPC, este es el mecanismo para contribuir a la persistencia de la enfermedad por períodos largos y con presentaciones subclínicas (Terpstra, 1992; Morilla,1997; Lozada y Morilla, 2002). En la infección por el virus de la FPC, la viremia, leucopenia, trombocitopenia e inmunosupresión, incrementan la susceptibilidad del animal a infecciones secundarias; el cerdo presenta un estado de choque y muere (Ramírez y Reynoso, 1995; Morilla, 1997).

1.4 Signos clínicos

Los signos clínicos en el animal dependen de varios factores, tales como la virulencia del agente etiológico, la susceptibilidad del animal a la infección, la vía de infección y su difusión, así como el estado inmune de los cerdos y la presencia asociada de otros agentes infecciosos, tanto virales como bacterianos o parasitarios (Laevens *et al.*, 1998). La mortalidad puede ser nula o llegar a un 100 % (Terpstra, 1992).

Los signos clínicos son apatía, por momentos manifiestan frío y temblores musculares, la cabeza agachada y la cola caída, posteriormente anorexia con polidipsia (Carbrey, 1986; Van Oirschot, 1992). Hay fiebre, incoordinación del tren posterior, conjuntivitis leve o severa, en algunos cerdos se presenta constipación y en otros diarrea amarillo – verdosa o grisácea. También suelen presentar vómito amarillento, postración y apilamiento de unos sobre otros, convulsiones, problemas respiratorios e hiperemia de la piel, desde el inicio de la enfermedad hasta la muerte y en los últimos días de la enfermedad es común la hipotermia con temperaturas de 37 a 38 ° C, cianosis en orejas, trompa, cola, patas, piernas, y periné, trastornos nerviosos (Correa *et al.*, 1981; Carbrey, 1986; Van Oirschot, 1992; Ramírez y Reynoso, 1995).

Las cepas de baja patogenicidad inducen una enfermedad leve o subclínica, la que puede acompañarse de leucopenia, o transformarse en una forma crónica, donde los cerdos presentan retraso en el crecimiento convirtiéndose en redrojos, lesiones hiperémicas en la piel, con espalda arqueada y pelo hirsuto.

Pueden sobrevivir hasta 100 días con signos clínicos, dependiendo de la presencia de

otros agentes virales y bacterianos que infecten al cerdo (Carbrey , 1986).

También se puede presentar una infección congénita presentándose abortos, momificaciones fetales, malformaciones, mortinatos y al nacimiento lechones débiles con temores, o aparentemente sanos (Ramírez y Reynoso, 1995).

Cuando los lechones se llegan a infectar in útero presentan hemorragias en piel con una alta mortalidad y los que sobreviven suelen recuperarse (Van Oirschot, 1992).

Se pueden observar ciertas diferencias en la infección generada por las cepas de baja virulencia y aquellas causadas por cepas virulentas (Terpstra, 1991).

1. Presentar un marcado porcentaje de infecciones y presentaciones clínicas inaparentes, atípicas y crónicas donde enmascaran su presencia, algo que no sucede con cepas virulentas.

2. La difusión es lenta en los cerdos susceptibles, por lo que presenta una enfermedad menos alarmante.

3. Otra característica es el “Síndrome de la cerda portadora”, cuando la cerda no muere y a diferencia de las cepas de alta virulencia provocando que las cerdas aborten o produzcan lechones nacidos débiles y estos mueren después del nacimiento (Terpstra, 1991).

4. También se ha reportado la presencia de cuadros clínicos con signología respiratoria que no cede ante la aplicación de antibióticos acompañado con alta morbilidad y alta mortalidad en cerdos de 3 y 4 meses de edad y con curso crónico, éstos lechones excreta el virus en forma continua o intermitente (Kim *et al.*, 1998).

1.5 Lesiones de fiebre porcina clásica.

Las lesiones en la fiebre porcina clásica dependen de que se presente la forma hiperaguda, aguda, subaguda o crónica. En términos generales están caracterizadas por trastornos vasculares, tales como hemorragias múltiples de varios tamaños, ocasionados por: la degeneración hidrópica y necrosis de células endoteliales, acompañadas con defectos en el mecanismo de coagulación sanguínea. En los sistemas digestivo, respiratorio y urogenital suelen presentarse reacciones inflamatorias de tipo catarral, fibrinosa y hemorrágica (Van Oirschot, 1992).

El virus de la FPC tiene afinidad por las células del sistema inmune, causando severa leucopenia, explicada por muerte celular (por necrosis y/o apoptosis), supresión de la hematopoyesis o cambios en la distribución de leucocitos, dentro de diferentes compartimentos del sistema inmune (Summerfield et al., 1998).

1.5.1 Lesiones por órgano

En la piel al inicio de la enfermedad se aprecia marcado eritema que posteriormente se vuelve cianótico debido a una circulación sanguínea cada vez más lenta de las partes afectadas.

Linfonodos. Por lo regular son de los primeros órganos que presentan cambios patológicos, tales como edema, hemorragias periféricas o difusas, dando aspecto marmoleado, congestión e inflamación. Microscópicamente se observa depleción de linfocitos e hiperplasia reticular.

Tonsilas. Presentan lesiones necróticas, infartos, inflamación y hemorragias.

Pulmones. Se observa congestión, edema y bronconeumonía difusa, pleuritis, pleuresía y hemorragias en forma de petequias.

Epiglotis y Laringe. Hemorragias petequiales y equimóticas.

Corazón. Hay congestión del miocardio y hemorragias petequiales o equimosis, acompañadas de hidropericardio.

Riñones. Con frecuencia presentan lesiones hemorrágicas (petequias y equimosis) localizadas en la superficie renal, dando la clásica denominación de “huevo de pava” y en la zona medular renal también se aprecian hemorragias.

Vejiga urinaria. Presenta petequias o equimosis.

Estómago. Por lo regular se encuentra vacío o con contenido líquido amarillento, con una pequeña cantidad de alimento e inflamación, congestión y hemorragias en la mucosa.

Intestinos. Muestran enteritis catarral y/o necrótica con petequias en la serosa y a nivel de la válvula ileocecal se encuentran úlceras botonosas, de forma elevada y con apariencia de capas concéntricas esta es una lesión provocada por los infartos.

Hígado. Se presenta congestionado, hemorrágico y con aumento de tamaño (hepatomegalia).

Bazo. Se observa con infartos en los bordes del órgano, ocasionados por trombos y daño

de flujo sanguíneo debido a la degeneración hidrónica de las células endoteliales lo cual se considera característico de FPC (Ramírez y Reynoso, 1995).

1.6 Vacunación contra la fiebre porcina clásica

La vacunación de la FPC tuvo como objetivo erradicar la FPC del territorio nacional, mediante la Norma Oficial Mexicana NOM-037-ZOO-1995, utilizando la cepa PAV-250

Siendo esta una vacuna virus vivo modificado, cultivada en la línea celular PK15, y dentro de sus características satisfactorias comprobadas por diversos investigadores son las siguientes: Es una cepa inocua, mantiene un alto porcentaje de protección, no se disemina de los cerdos vacunados, no hay posibilidades a la regresión virulenta, tiene confiabilidad de vacunar a cerdos de cualquier edad, etc..(Correa *et al.*, 1975; Morilla, 1998). Y mediante el sistema de vacunación intensiva, en la porcicultura tecnificada y de traspatio, se utiliza esta cepa para reducir y prevenir los brotes de FPC, al proporcionar una buena inmunidad a los cerdos, pero en ocasiones por diversas causas se ha constatado que otras vacunas no llegan a inducir la protección inmunológica necesaria, esto ocasiona fallas vacunales provocadas por :

Fracasos en el cerdo cuando se esta incubando la enfermedad o por una mala aplicación de la vacuna, por infecciones concomitantes, mal manejo de la vacuna en la cadena fría, bajo título, eficacia o potencia. (Correa, 1981; Tizard, 1992; Morilla, 1997).

También la vacunación será menos efectiva cuando interactúan varios factores, como la presencia de virus de baja virulencia, síndrome de la cerda portadora, causado por cepas de baja virulencia, persistencia de infecciones tardías en los lechones infectados congénitamente, pero sin presentar signos, infecciones subclínicas, y con multiplicación viral con excreción (Terpstra, 1992).

1.7 Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS)

1.7.1 Etiología

El agente causal de esta enfermedad es un virus con envoltura de pequeño tamaño, clasificado en la familia Arteriviridae, Género Arterivirus las partículas maduras de 50 – 72 nm de diámetro, son esféricas y poseen una cápside icosaédrica de 20 – 30 nm, la cuál engloba una molécula de RNA. Dada la diversidad existente entre los distintos aislados de PRRS, estos se clasifican en dos grandes tipos antigénicos, el

Europeo y el Americano (Sánchez- Vizcaíno y Arias, 2003).

En la actualidad, el virus de PRRS es endémico en casi todas las áreas productoras de cerdos en el mundo. Se cree que algunos países están libres del virus tales como Australia, Noruega, Suecia, Suiza y EUA, pero los estados de infección de un país pueden cambiar rápidamente (Zimmerman y Kyoung, 2000).

1.7.2 Epidemiología

La presencia de anticuerpos contra el virus de PRRS se reporto por primera vez en 1994 en cerdos importados y del país de varias granjas en los Estados de Sonora, Jalisco, Aguascalientes y Guanajuato cuando fueron analizados 491 sueros (Correa et al., 1994). La SAGARPA en 1999, realizó el reconocimiento oficial de la presencia de la enfermedad en México (Mendoza y Ciprián, 2001).

El virus del PRRS tiene un patrón epidemiológico no definido, pues dependiendo de la virulencia del patógeno, del tipo de cepa, la predisposición del huésped, su respuesta inmune y la dosis de infección, puede presentarse como una epizootia o una enzootia y a veces se encuentra en un punto intermedio. El patrón epidemiológico del virus PRRS puede variar de acuerdo al sitio de infección, si la enfermedad es reproductiva, se manifiesta más como una epizootia, desarrollando una buena inmunidad (en un brote de la forma reproductiva, normalmente la piara retorna a su estado normal dentro de algunos meses), pero si se presenta en la forma respiratoria, se manifiesta como una enzootia con una débil respuesta inmune y una variación muy grande en la severidad de los signos clínicos (Zimmerman and Kyoung, 2000; Blaha, 2000).

1.8 Transmisión

Los animales infectados diseminan el virus principalmente por la saliva, hasta los 42 días postinfección; en la orina a los 14 días; y en el semen de los 15 a los 92 días, también se sabe que puede diseminarse por las secreciones mamarias, una vez eliminado el virus es transmitido por contacto directo, por medio de los fomites, de los cerdos infectados a los sanos; o bien entre granjas, con el intercambio de animales. Otra forma de transmisión es la vía genital, a través del semen, al momento de inseminar o en la monta directa. Así también por la vía trasplacentaria, de la madre al feto (Arias et al., 2003)

Una vez infectados los cerdos aparentemente sanos, o los recuperados clínicamente, pueden mantener todavía la infección en forma subclínica durante varios meses, los cuales quedan como reservorios (Zimmerman y Kyoung, 2000; Arias *et al.*, 2003)

En la actualidad hay estudios donde se menciona que al infectarse los cerdos con el virus del PRRS hay mayor incidencia y gravedad de patologías secundarias, debido a la presencia de *Mycoplasma hyopneumoniae*, fiebre porcina clásica, *Streptococcus suis*, Circovirus porcino Tipo 2, influenza, etc. (Díaz, 2003).

Esta situación se interpreta como evidencia de que el virus PRRS tiene propiedades inmunosupresoras, pero en condiciones experimentales se ha demostrado lo contrario (Lager *et al.*, 2002). Otros estudios han demostrado que existe una disminución de la función de las células efectoras del pulmón así como una disminución en su número (Arias *et al.*, 2003).

1.9 Patogenia

La patogénesis del VPRRS se inicia con una infección en el cerdo cuando entra principalmente por la vía respiratoria y la bucal a través del epitelio nasal, tonsilar y en los macrófagos pulmonares; el período de incubación es muy variable que va desde los 3 días hasta varias semanas. Cabe destacar que también existe la vía de entrada genital donde el virus infecta el endometrio uterino y una vez que se replica el virus en las células de los tejidos antes mencionados, éste se disemina por vía sanguínea, en forma libre o junto con monocitos circulantes, esto produce una leucopenia, el virus llega a los tejidos linfoides y de allí se distribuye en forma sistémica a otros órganos, dando como resultado la presencia de una infección por diseminación viral, presentando los signos y lesiones características como pueden ser rinitis, neumonía, vasculitis, linfadenopatía, etc. (Sánchez- Vizcaíno y Arias, 2003).

El virus es capaz de multiplicarse en las células fagocíticas, a través de un mecanismo dependiente de anticuerpos, este mecanismo se basa en la unión del complejo antígeno – anticuerpo en la membrana celular donde hay un receptor de la fracción Fc del anticuerpo y de este modo facilita la entrada a las células blanco. Los macrófagos alveolares pertenecientes a lechones menores de 6 semanas de edad son más susceptibles a la infección por este virus, debido a esto la enfermedad es más grave en los animales más jóvenes. (Arias *et al.*, 2003).

La viremia producida por el virus del PRRS, en animales jóvenes, puede durar más de

un mes, cuando el virus llega a distintos órganos como son: corazón, hígado, riñón, cerebro, pulmón, nódulos linfáticos peribronquiales, timo, amígdalas, médula ósea y bazo, en este último el virus se replica en los macrófagos. En las hembras gestantes el virus atraviesa la placenta y produce muerte fetal, específicamente cuando la infección ocurre en el último tercio de la gestación; así mismo el virus puede replicarse en los fetos sin producir la muerte, y cuando la infección ocurre en el primer tercio de gestación se presentan repeticiones de celo y bajas tasas de concepción (Arias *et al.*, 2003).

Se ha descrito la presencia de cepas con distintas características patógenicas, algunas son muy virulentas y otras de baja virulencia; esto provoca la presencia de un PRRS agudo o un PRRS atípico, este último es debido a las cepas de alta virulencia (Holland, 1995; Sánchez-Vizcaino y Arias, 2003).

El ciclo de replicación viral es rápido y la infección produce lisis de la célula y una apoptosis inducida en las células adyacentes, pero no en las células infectadas. Parte de esto induce lesiones asociadas a enfermedades respiratorias y bajo estas consideraciones se han podido detectar cantidades muy bajas del virus. Esto hace sospechar que la lesión pulmonar se atribuye a la liberación de citocinas proinflamatorias de los macrófagos infectados por el virus (Benfield *et al.*, 1999).

Se ha logrado determinar que el virus del PRRS entra a la célula por endocitosis, mediada por un receptor, pero no se sabe con precisión, qué cambios ocurren dentro de la célula. Así mismo se ha reportado que el virus del PRRS es un inductor de apoptosis *in vivo e in vitro*, sugiriendo que la apoptosis ocurre en otras células y no en las que el virus se replica, se reconocen dos períodos, uno agudo caracterizado porque durante las primeras dos semanas de infección se alcanzan máximos títulos virales en los órganos susceptibles, el otro período es el persistente o crónico, donde los niveles de replicación viral son bajos y sólo en algunos órganos (amígdalas, bazo y tejido linfoide) pero no en el pulmón (Suárez, 2000).

1.10 Signos clínicos

Los signos clínicos son muy variables por que dependen de la inmunidad de los animales, de la cepa del virus y de factores de manejo.

En términos generales tiene una presentación aguda o hiperaguda y una crónica, las cepas de baja virulencia producen infecciones subclínicas o endémicas. El cerdo

afectado cursa con disnea, inapetencia, anorexia, postración, fiebre, disminución del crecimiento, apatía, emaciación, lechones de tres semanas con parpados hinchados, aumento de mortalidad, en algunos cerdos, eritema y/o cianosis de las orejas, trompa, rabo, patas, vulva, mamas, bajo rendimiento reproductivo en las hembras primerizas, abortos, partos prematuros, partos con más de 115 días, nacidos muertos, momificados, nacidos débiles, elevada mortalidad en el predestete, etc...

1.11 Lesiones

Las lesiones dependen en su gran mayoría de la cepa vírica que infecte a los cerdos, de la edad de los cerdos, de la genética, complicaciones con otros agentes bacterianos y virales, así como de la presencia de agentes estresantes.

El virus PRRS produce lesiones multisistémicas. Sin embargo, las lesiones macroscópicas sólo se observan principalmente en pulmón y tejido linfoide, pero en animales jóvenes (lechones destetados) son mucho más evidentes y los estudios patogénicos han descrito lesiones pulmonares, tales como neumonía intersticial acompañada de infiltración de células mononucleares, y si no se complica con agentes infecciosos secundarios (virus y bacterias), puede desarrollar engrosamiento de los tabiques interalveolares, con infiltración celular, en los espacios alveolares se observa la presencia de macrófagos necróticos. Así como también se presenta linfadenopatía generalizada, con mayor frecuencia en nódulos linfáticos torácicos, cervicales e inguinales (hipertrofia e hiperplasia). También se ha observado encefalitis, rinitis, miocarditis, arteritis y necrosis de las células endoteliales de los capilares.

Inmediatamente después de la infección se ha demostrado una disminución de la función de los macrófagos alveolares e intravasculares, producto de las lesiones y daños que sufren durante la infección viral, y se cree que este mecanismo sea el causante del desarrollo de infecciones secundarias.

1.12 Sistema Inmune del cerdo

1.12.1 Componentes del sistema inmune

Los órganos linfoides primarios, están formados en la médula ósea y el timo, su función es la de producir, regular y diferenciar, la producción de los distintos linfocitos; en la médula ósea se produce la maduración de los linfocitos B y en el timo las distintas poblaciones de linfocitos T.

Órganos linfoides secundarios

A nivel sistémico se considera que están representados por los nódulos linfáticos y el bazo y a nivel de mucosas por el tejido linfoide asociado a las mucosas como, son las tonsilas y las placas de Péyer. Los nódulos linfáticos son formaciones nodulares de tejido conectivo denso, de color blanquecino, que tienen como función la de retener los antígenos que puedan llegar a través de los líquidos linfáticos y proceder a su presentación y procesamiento antigénico mediante la colaboración con los macrófagos y los linfocitos que los componen. El bazo es un órgano linfoide de doble función, por un lado filtra la sangre para el reconocimiento de antígenos y por el otro sirve como almacén de producción de células sanguíneas, tales como eritrocitos y plaquetas. (Tizard, 1992).

Las tonsilas son de tejido linfoide asociado a las mucosas y juegan un papel importante en el sistema inmune, ya que en el cerdo un gran número de agentes patógenos utilizan las mucosas como vías de entrada, sus mecanismos están mediados por inmunoglobulinas del isotipo IgA en un 80%. Están formadas por los folículos linfoides con sus centros germinativos, que son agrupaciones circunscritas y compactas formadas por gran cantidad de linfocitos B, que se encuentran dentro del tejido linfoide difuso, principalmente formado por linfocitos T. Todo ello, asociado íntimamente al epitelio. (Morilla, 1993).

Las placas de Peyer yeyunales. Son placas de pequeño tamaño (alrededor de 25 a 35 placas) distribuidas a lo largo del yeyuno y porción proximal del íleon y que persisten durante toda la vida del cerdo. Están formadas por linfocitos B y T. (Sánchez-Vizcaíno, 2004).

Las placas de Peyer ileocecales. Son de grandes dimensiones, están localizadas en la porción terminal del íleon e involucionan durante el primer año de vida del animal. Su composición celular también difiere de la de las placas yeyunales. Así, en las ileocecales existe una proporción de linfocitos B diez veces superior que de linfocitos T. (Morilla, 1993; Tizard, 1992; Sánchez-Vizcaíno, 2004).

1.12.2 Células del sistema inmune del cerdo

Desde un punto de vista morfológico, al microscopio óptico no se encuentran diferencias entre los linfocitos B y T. Ambos linfocitos son células de entre 7 y 9 micras de tamaño, presentan un núcleo voluminoso y escaso citoplasma. Por microscopía

electrónica de barrido, existen algunas diferencias notables. Así, los linfocitos T presentan una superficie suave y plana, mientras que los linfocitos B presentan una superficie con múltiples proyecciones que corresponden a las inmunoglobulinas de superficie. (Sánchez-Vizcaíno, 2004).

Los linfocitos B estimulados, tanto por los antígenos T dependientes como por los T independientes, se transforman en un clon de células plasmáticas que producirán y segregarán anticuerpos en gran cantidad. Estos anticuerpos son específicos frente al epítipo que indujo la respuesta inmune. Esta respuesta inmune, mediada sólo por anticuerpos, se denomina respuesta humoral (Morilla, 1993).

Los linfocitos T del cerdo se producen en el timo y en menor proporción en las zonas T dependientes de los órganos linfoides secundarios. A diferencia de los linfocitos B, no presentan inmunoglobulinas en su superficie. Los linfocitos T juegan un papel fundamental en la respuesta inmune, por un lado, favoreciendo la activación de los mecanismos de presentación de antígenos a los linfocitos B para la producción de anticuerpos y por otra parte, como responsables de la inmunidad celular (Morilla, 1993). En la membrana de los linfocitos T, además del antígeno de histocompatibilidad porcina (SLA), se pueden diferenciar dos tipos distintos de receptores específicos para el antígeno, denominados TcR derivados de las palabras inglesa, "T cell receptor". Estos receptores son: receptores α y β TcR, que representan entre el 40 y el 60% de los linfocitos de la sangre periférica, son linfocitos cooperadores CD4+, y los linfocitos citolíticos CD8+, representan los linfocitos T; y tras la presentación antigénica los linfocitos CD4 pasan por una fase de diferenciación denominada Th0 donde diferencian sus acciones como la producción de citocinas de manera que favorezcan la respuesta celular (activación de Th1) o la respuesta humoral (activación de Th2). El cambio de Th0 a Th1 o a Th2 dependerá de la señal que Th0 reciba durante la presentación antigénica. El mecanismo por el que se produce una u otra señal todavía es poco conocido, pero parece depender de la naturaleza del patógeno (Th1 en intracelulares), de las citocinas liberadas por la célula presentadora, de la dosis del antígeno, etc...

Los lincitos Th1 estimulan fundamentalmente la respuesta de los linfocitos CD8, mientras que los linfocitos Th2 están mas especializados en la activación de los linfocitos B para la producción de anticuerpos (Sánchez-Vizcaíno, 2004).

1.12.3 Citocinas

Se denominan citocinas al conjunto de proteínas que secretan diferentes células, fundamentalmente del sistema inmune, como respuesta a una estimulación inmunológica o como señal intercelular tras la estimulación de una de ellas. Las citocinas presentan gran variedad de funciones y son de gran importancia en la respuesta inmune, tanto natural o innata, como adquirida.

Se han agrupado bajo el nombre genérico de citocinas todas las proteínas, generalmente glicosiladas y de bajo peso molecular, secretadas por las células del sistema inmune, fundamentalmente por monocitos y linfocitos T, aunque también producen citocinas otras células no inmunes, como: las células endoteliales y fibroblastos. Anteriormente, se denominaban las citocinas en función del origen de la célula secretora, así se definieron como: linfocinas (producidas por linfocitos) monocinas (monocitos) o dependiendo de su actividad: quimiocinas, interleucinas, interferones (Wens *et al.*, 1998).

Las citocinas juegan un papel fundamental en la respuesta natural, mediante mecanismos de acción directa frente al agente invasor (evitando la infección de las células por diferentes virus) o mediante mecanismos de activación celular (NK y macrófagos) que a su vez liberan más citocinas.

El factor de necrosis tumoral (TNF α) es el principal iniciador de la respuesta inflamatoria, actúa sobre los vasos de la zona afectada aumentando la permeabilidad vascular, facilitando la extravasación de inmunoglobulinas, del complemento, de los factores quimiotácticos, etc.. Mediante este mecanismo ayuda al organismo en su defensa contra la agresión de los agentes infecciosos (Sánchez-Vizcaíno, 2004).

Las IL 1, IL 6, IL 12 intervienen en la respuesta natural, activando a los monocitos-macrófagos y a las células NK, así como, facilitando la activación de los mecanismos de elevación de la temperatura corporal, para activar el sistema inmune y reducir el poder de multiplicación o replicación del agente patógeno (Sánchez-Vizcaíno, 2004).

El interferón (IFN) que presenta los tipos: α , β y γ puede actuar de formas distintas para evitar la infección viral. La primera de ellas, inducidas por el IFN α y β , que son producidos fundamentalmente por monocitos-macrófagos y en menor proporción por fibroblastos, es la de inducir en las células susceptibles a la infección por virus un estado de resistencia transitoria frente a la infección de una gran gama de agentes

víricos. Este efecto de gran poder antiviral, no requiere de grandes cantidades de interferón y constituye uno de los mecanismos principales en la respuesta natural (Sánchez-Vizcaíno, 2004).

Por otra parte, estos interferones aumentan la expresión del SLA I en las células infectadas, lo que favorece el reconocimiento de las mismas por los linfocitos CD8+ y las células NK, con el consiguiente aumento de la actividad citotóxica (Sánchez-Vizcaíno, 2004).

El IFN γ presenta una estructura distinta a los IFN α y β y es producido por los linfocitos T CD4+ y CD8+ y por las células NK tras recibir una estimulación antigénica. El IFN γ , además de presentar actividad antiviral, interviene en muchas funciones inmunoregulatoras, tales como: aumentar la expresión del SLA I (favorece la citotoxicidad) y del SLA II (favorece la colaboración celular para la presentación de los antígenos y la producción de anticuerpos).

En el cerdo se ha detectado interferón durante la infección con varios virus (gastroenteritis transmisible, influenza, peste porcina clásica, enfermedad de Aujeszky), comprobándose, en algunas de ellas, su capacidad para aumentar o modular la expresión de los SLA (Sánchez-Vizcaíno, 2004).

La inmunidad del cerdo en cuanto a los mecanismos celulares presenta una respuesta natural y el mecanismo más importante es la activación de los macrófagos y las células NK, mientras que en la inmunidad adquirida es la activación de los linfocitos CD4 + y CD8 +. En ambas respuestas, juegan un papel de gran importancia las citocinas (Sánchez-Vizcaíno, 2004).

1.12.4 El sistema inmune frente a los virus

Los virus necesitan de la maquinaria de la célula a la cual infectan para sintetizar sus proteínas. Son parásitos intracelulares que dependen de la célula infectada para poder llevar a cabo su replicación. Los virus presentan generalmente formas muy sencillas, compuestas por proteínas y un ácido nucleico, aunque su estructura y composición es muy variable. Se clasifican de acuerdo al tipo de ácido nucleico que portan, en: virus ADN y ARN, y por su forma y estructura en diferentes familias. Ejemplos: fiebre porcina clásica, familia Flaviviridae, tipo ARN; síndrome respiratorio y reproductivo porcino, familia Arteriviridae, tipo ARN.

Conocer el ciclo de replicación viral es importante, para prever las oportunidades que

tienen los diferentes mecanismos inmunitarios, para interactuar con la partícula viral, con las células infectadas, o con ambas. Normalmente, el ciclo de replicación viral comienza por la unión del virus (virus libre) a la célula hospedadora, a través de receptores específicos (adsorción), estos receptores son los que marcan el tropismo y la especificidad de la infección (no pueden infectar a cualquier célula ni a cualquier especie, tienen su tropismo específico), una vez en la célula, el virus elimina su cubierta dejando su ácido nucleico libre (descubrimiento), para iniciar el proceso de replicación vírica. (Sánchez-Vizcaíno, 2004).

En esta fase, la síntesis de proteínas celulares se inhibe y solamente se procesará la información genética del virus, los mecanismos que actúan en esta fase, dependen del tipo de ácido nucleico del virus (ADN o ARN). En el caso de los virus ADN, se produce una replicación, formando un ADN viral nuevo, este ADN viral nuevo, mediante transcripción, pasa a ARN viral, el cual mediante traducción, irá produciendo las diferentes proteínas virales y posteriormente el ensamblaje viral. En el caso de los virus ARN, no hace falta la transcripción, pasando directamente el ARN viral nuevo a la producción de las proteínas. Este mecanismo de replicación del ARN, es diferente para los retrovirus, los cuales a partir del ARN viral, mediante una transcriptasa inversa, forman ADN viral (el cual se une al genoma celular) a partir de lo cual comienzan las diferentes fases de replicación (Sánchez – Vizcaíno, 2004).

Desde el punto de vista inmunológico, las infecciones víricas pueden combatirse, una vez que atraviesen las barreras físico químicas, luchando contra la partícula viral (virión), contra las células infectadas o contra ambas, mediante los diferentes mecanismos de la respuesta natural y adquirida (Sánchez – Vizcaíno, 2004).

1.12.5 Respuesta natural frente a los virus

Los mecanismos de la respuesta natural más activos frente a las infecciones virales están mediados por el interferón y por la activación de las células NK. Estos mecanismos están dirigidos hacia las células infectadas.

El interferón es una citocina de la que se conocen tres tipos, denominados: α , β y γ , los dos primeros, se producen fundamentalmente por los monocitos-macrófagos y en menor proporción por los fibroblastos, mientras que el interferón γ lo producen los linfocitos CD4 y CD8 y las células NK. El interferón, presenta gran capacidad antiviral, induciendo diferentes mecanismos, tales como: resistencia transitoria de las células y la

inducción de diferentes moléculas con actividad antivírica; la activación de genes que expresan proteínas antivirales e incremento de la expresión del CMH I y del CMH II.

Las células NK se activan de manera natural frente a células infectadas por virus.

El mecanismo de activación parece estar ligado a las alteraciones en la expresión del CMH en las células infectadas. La reacción de las NK con las células infectadas, no está basada en una reacción antigénica (las NK no tiene TcR). Este mecanismo citotóxico es muy eficaz en las infecciones víricas. Otro mecanismo que también actúa es, la vía alternativa del complemento que activa la virolisis de las partículas virales con gran eficacia (Sánchez-Vizcaíno, 2004).

1.12.6 Respuesta adquirida frente a los virus.

La inmunidad adquirida reacciona frente a las infecciones víricas, tanto a nivel de la partícula viral, como frente a la célula infectada con la partícula viral, el mecanismo inmunológico más importante son los anticuerpos, mientras que frente a la célula infectada, son los mecanismos citotóxicos, mediados por células (CD8+) o por anticuerpos y células (ADCC) o anticuerpos y complemento (vía clásica).

Respuesta inmune frente a la partícula viral. La cápside de la partícula viral está formada por proteínas, por lo que es muy antigénica, e induce gran cantidad de anticuerpos que pueden ejercer diferentes acciones frente a los virus y eliminar la infección mediante anticuerpos (IgG, IgA y IgM), evitando que el virus pueda penetrar en las células, mediante aglutinación viral (IgM), para reducir el número de unidades infecciosas disponibles, así mismo la activación de la fagocitosis al formar el complejo antígeno anticuerpo y estimular el receptor Fc de los macrófagos.

Respuesta inmune frente a la célula infectada. Las células infectadas por virus pueden expresar en su membrana antígenos virales, mucho antes de que se produzca el ensamblaje viral, por lo que su destrucción, es un excelente mecanismo para evitar la formación de más virus. La respuesta adquirida hace frente a las células infectadas mediante, anticuerpos (sistema ADCC), activación del complemento por la vía clásica, activación de la fagocitosis, como por la citotoxicidad celular mediada por linfocitos CD 8+ que es uno de los mecanismos más efectivos frente a las infecciones virales (Sánchez-Vizcaíno, 2004).

2.0 Justificación

Se observó que con frecuencia en las piaras del altiplano mexicano que después de aplicar la vacuna de FPC cepa PAV- 250 se presentan aspectos clínicos-respiratorios, en lechones destetados de 30 días, durante un período de 7 a 15 días después de su aplicación, donde los lechones presentaban signos clínicos respiratorios sugestivos a la enfermedad producida por el virus del PRRS, y acompañados con pérdida de peso, debilidad, retraso en el crecimiento y baja conversión alimenticia, esto se reflejó en cerdos con mayor tiempo de salida al mercado y con un menor peso, dando como resultado final una pérdida económica en la producción porcina.

Por otro lado se presentaron antecedentes en un estudio de 5 granjas de La Piedad Michoacán, sobre las manifestaciones clínicas de tipo respiratorio cuando se vacunaron lechones de 30 a 40 días de edad con la cepa PAV- 250 y donde el diagnóstico de laboratorio fue del virus del PRRS (Pineda *et al.*, 2002), se pensó que la aplicación de la vacuna de FPC provocó la aparición clínica del PRRS en las granjas afectadas.

Así mismo existen antecedentes de la potencialización de la neumonía en cerdos de crecimiento, por la presencia del virus del PRRS cuando se aplica la bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae*, dando también como resultado una posible falla vacunal (Thacker y Halbur, 1999).

En base a lo anterior se pretende que mediante el presente estudio se conocerá la dinámica de la infección del virus del síndrome respiratorio reproductivo porcino, en lechones vacunados con el virus de la fiebre porcina clásica y se determinará si la vacunación con el virus de la fiebre porcina clásica interacciona y contribuye con la patogénesis y presentación clínica de la enfermedad causada por el virus del síndrome respiratorio reproductivo porcino.

El resultado de este tipo de reacciones en lechones produce grandes pérdidas económicas a la porcicultura nacional y mundial.

Así mismo, con el desarrollo y resultados de este estudio, se obtendrán posibles alternativas de solución del uso de biológicos como la vacuna de FPC, en presencia del virus del PRRS, situación que al ser aplicada en piaras porcinas reduciría considerablemente las pérdidas económicas ocasionadas por la interacción de la vacuna contra la FPC y el virus del PRRS.

3.0 Hipótesis

Si el virus vacunal de la Fiebre Porcina Clásica (FPC) se aplica en lechones infectados con el virus del Síndrome Respiratorio Reproductivo Porcino (PRRS), se presentara una sinergia, en la patogenicidad de éste, agravándose el cuadro clínico de la enfermedad.

4.0 Objetivo general

Evaluar experimentalmente en lechones con PRRS, si la vacunación contra el virus de la FPC interacciona con el virus patógeno del PRRS, para que se presente en forma más severa y permanezca esta enfermedad

4.1 Objetivos particulares

Para determinar si ocurre el efecto de una interacción entre el virus vacunal de FPC y del virus virulento del PRRS se precederá a lo siguiente.

- 1.- Evaluar los signos clínicos respiratorios de los lechones vacunados con la cepa PAV-250 de FPC y desafiados virus del PRRS.
- 2.- Comparar el perfil de la cuenta leucocitaria de todos los lechones de todos los grupos experimentales mediante la técnica de la biometría hemática.
- 3.- Determinar el nivel de anticuerpos contra el virus de la FPC mediante la técnica de ELISA en los lechones de los ocho grupos del diseño experimental.
- 4.- Comprobar la presencia de los dos virus inoculados mediante técnicas de RT PCR
- 5.- Evaluar las lesiones pulmonares macroscópicas mediante planimetría de los lechones de todos los grupos de éste experimento.
- 7.- Desafiar con la cepa AMES del virus de la FPC a todos los lechones del experimento para verificar la protección de la vacunación con la cepa PAV- 250 de FPC, en presencia del virus PRRS.

5.0 Material y métodos.

5.1. Cultivo y cosecha de células

Las células que se utilizaron para preparar el inóculo del VPRRS, fueron de riñón de mono verde africano conocidas como MA-104. Primeramente se hizo un cultivo celular, examinando el monoestrato que no tuviera signos de contaminación o algún deterioro celular. Posteriormente se retiró el medio mínimo esencial de Eagle (EMEM) de las cajas de Falcón de 25 cm²; se lava el monoestrato con 0.2 ml/cm² de solución buffer de fosfatos (PBSA) por 5 minutos, en seguida se adicionaron 0.1 ml/cm² de tripsina sobre la cara opuesta donde se encontraba el monoestrato y se invirtió la caja para que actuara la tripsina por 15 seg., se observó al microscopio invertido y cuando la formación bidimensional de las células se perdió y se volvieron redondeadas, se retiró parte de la tripsina hasta dejar una capa fina que cubriera las células e inmediatamente se incubó la caja con la tripsina en posición horizontal por 5 minutos a 37°C. Una vez pasado este tiempo se observaron las cajas al microscopio, hasta ver que el monoestrato se desprendió completamente y enseguida se adicionó 1 ml de medio de crecimiento (EMEM, con 10% de suero fetal bovino (BSF) para retirar a las células aún adheridas a la superficie de la caja, con ayuda de una perilla, y por medio de pipeteos repetidos se homogenizó la suspensión sin hacer espuma. Con la ayuda de pipetas y puntas se tomó una muestra de las células y se procedió a contarlas en un hemocitómetro, una vez contadas éstas fueron sembradas en cajas Falcón de 25 o 75 cm² y se les agregó EMEM junto con 1.5 g/L de NaHCO₃. al 1%, de piruvato y aminoácidos no esenciales, más 10% de BFS en un volumen de 0.2 ml/cm², a una cantidad de 5 y 35 ml respectivamente; las cajas con la suspensión de células se incubaron en una estufa de cultivo a 37°C, hasta el siguiente subcultivo o cuando el rojo de fenol contenido en el medio indicara la necesidad de renovar el medio.

5.2 Conteo de las células

Se realizó el conteo de las células en un hemocitómetro, una vez que se lleva a cabo el subcultivo de los monoestratos hasta la tripsinización, se le adiciona 1 ml de medio de mantenimiento para detener el efecto de la tripsina, se homogenizaron las células con una pipeta y se tomo una muestra de 50µl de la suspensión celular y se deposito en una orilla de la cámara del hematocitómetro para que la suspensión se deslice por capilaridad hasta que llene el campo marcado, se procedió a llenar la otra parte de la cámara, se hace presión sobre el cubrecámara para estabilizar una profundidad de 0.1mm. Se hizo la lectura con el objetivo de 10X del microscopio óptico, se delimita el campo de la lectura y se cuentan las células existentes en las 4 esquinas y del cuadro central del campo de 1mm², para sumar el número total de células existentes se toma en cuenta los 5 cuadrados más los otros 5 cuadros del lado contrario. Se obtuvo el número de células promedio por cuadro y se multiplico por 10⁴, y el resultado obtenido es el numero de células por mililitro, y cada vez que se subcultiven en cajas nuevas se adicionan 5x10⁴ células por ml o bien para las cajas de cultivo de 25 y de 175 cm² se adicionan 1.25x10⁶ y 8.75x 10⁶ células, respectivamente (Vargas, 2003).

5.3 Titulación del virus patógeno

Se sembraron células de riñón de mono verde africano conocida como MA - 104 en cajas Falcón de 25 cm² a las que se les proporciono un volumen de 5ml de medio de crecimiento (EMEM más SFB%) y enseguida se incubaron a 37 °C por 48 horas o hasta alcanzar una confluencia del 80%. Pasado este tiempo se retiró el medio y la monocapa de células se lavó con PBSA por 5 minutos en dos ocasiones, y se retiró el buffer. Enseguida se adiciona 2 ml de suspensión del VPPRS y se dejaron las cajas con células en incubación durante una hora a 37 °C, inmediatamente se agregaron 3 ml de medio de mantenimiento (EMEM más SFB3%) sin retirar el inóculo viral e incubándose por 3 días a 37 °C, pasando este tiempo se observaron las cajas en el microscopio invertido para buscar el efecto citopático, una vez localizado este daño la caja Falcón se metieron en congelación (-80 °C) hasta ser requeridas.

5.4 Animales.

Se utilizaron 40 lechones SPF cruzados de las razas York, Ham, landrace, de 21 días de edad, adquiridos de una granja comercial, libres de anticuerpos contra FPC y PRRS y libres de estos virus y procedentes de madres libres de estos agentes. Se obtuvo una muestra de sangre de cada lechón antes del experimento y mediante técnicas de PCR y/o serología se comprobó que no tuvieran anticuerpos contra los virus de FPC y del PRRS.

5.5 Inoculación de los lechones

Los lechones fueron inoculados con el virus del PRRS a una CCID₅₀ (dosis infectante de cultivos celulares) 10^4 focos fluorescentes de la cepa de referencia (ATCC No.2332), con 2 ml/cerdo, vía intramuscular, a los grupos 2, 4, 5, 6, 7 y 8 respectivamente. Para los cerdos vacunados contra la FPC se utilizó la cepa vacunal PAV-250, a una dosis de 2.0 ml por vía intramuscular, utilizando una aguja por cerdo, en los grupos 3, 4, 5 y 6, 7 y 8 respectivamente. Para el grupo control negativo se aplicó un placebo de 2ml de solución salina fisiológica estéril (SSF), por vía intramuscular.

5.6 Diseño experimental.

- Se formaron ocho grupos de 5 lechones SPF, asignados de forma aleatoria, y los tratamientos recibidos consistieron en la vacunación con la cepa PAV- 250 de la FPC y el virus del PRRS, fueron inoculados intramuscularmente con 2 ml por cerdo respectivamente. El orden de los grupos quedó de la siguiente forma: (ver Cuadro No. 1).
- * Grupo 1: Control, sólo se aplica solución salina fisiológica, 2ml/ SC, el día cero.
- * Grupo2: Inoculación intramuscular 2 ml con el virus de PRRS, únicamente el día cero.
- * Grupo 3: Vacunación con 2 ml del virus vacunal contra la FPC, únicamente el día cero.
- * Grupo 4: Vacunación con 2 ml del virus vacunal contra la FPC e inoculación de 2 ml con el virus de PRRS , ambos el día cero.
- Grupo 5: Vacunación con 2 ml del virus vacunal contra la FPC, el día menos 7 e inoculación de 2 ml con el virus del PRRS el día cero.
- * Grupo 6: Inoculación de 2 ml con el virus del PRRS el día menos 7 y vacunación con 2 ml del virus vacunal de FPC, el día cero
- * Grupo 7: Vacunación con 2 ml del virus vacunal contra la FPC, el día menos 14 e inoculación de 2 ml con el virus del PRRS el día cero.
- Grupo 8: Inoculación de 2 ml con el virus del PRRS el día menos 14 y vacunación con 2 ml del virus vacunal de FPC, el día cero

Cuadro1. Diseño y formación dinámica de los 8 grupos experimentales utilizando 5 animales por grupo

Grupos *	** Tratamientos	Vacunación FPC cepa PAV-250(+) e Inoculación con VPRRS(++) Días			Desafió con virus de FPC Día 30 ***
		-14	-7	0	
1/5	Control negativo				+
2/5	Control VPRRS			+	+
3/5	Control Vacuna FPC			+	+
4/5	Vacuna FPC			+	+
	VPRRS			++	
5/5	VPRRS			++	+
	Vacuna FPC		+		
6/5	VPRRS		++		+
	Vacuna FPC			+	
7/5	VPRRS			++	+
	Vacuna FPC	+			
8/5	vPRRS	++			+
	Vacuna FPC			+	

* Cada grupo consistió de 5 lechones SPF de 21 días de edad

** De todos los cerdos se colectaron 15 ml de muestras sanguíneas los días -14,-9, -7, -2, 0, 5, 7, 14, 21, 28, 34, 37, 44 y 51; el día 52 se sacrificaron

*** Necropsias a todos los cerdos que murieron después del desafío con el virus patógeno de FPC, cepa Ames.

5.7 Parámetros a evaluar

5.7.1 Evaluación clínica.

Los lechones fueron observados clínicamente, todos los días a por la mañana, en la primera hora antes del manejo. Y posteriormente, durante el manejo, se observó la cantidad de alimento que comieron, incremento de la frecuencia respiratoria, postración de los lechones, aspecto del lechón en su pelaje, presencia de cambios circulatorios en la cara (orejas, región oronasal, etc.), las observaciones fueron registradas y posteriormente se describieron y analizaron estadísticamente.

5.7.2 Registro de la temperatura

Diariamente se tomó la temperatura corporal por vía rectal a cada uno de todos los lechones de todos los grupos del experimento, antes de proceder al manejo y el resultado se registró en formatos preestablecidos para cada uno de los grupos. Estos se colocaron en bolsas de plástico que contenían algodón con un desinfectante químico a base de formol, fenol y cloro. Para sacarlos posteriormente de las unidades de aislamiento al terminar el experimento todas y cada una de las hojas de registro, enseguida fueron colocadas en una estufa de incubación a una temperatura de 60°C, por un periodo de sesenta a noventa días, con la finalidad de eliminar posibles patógenos presentes.

Se procedió a registrar todos los datos obtenidos de la temperatura rectal de todos los lechones de cada uno de los grupos del experimento.

5.7.3 Serología

De todos los lechones del experimento se colectó una muestra de sangre de 5 ml por lechón directamente de la vena yugular, los días -14, -9, -7, -2, 0, 5, 7, 14, 21, 28, 35, 37, y 44 de todos los lechones del experimento. Los sueros fueron utilizados para medir el perfil de anticuerpos contra el virus vacunal de FPC, mediante la prueba de inmunodiagnóstico comercial disponible “Enzyme linked immunofluorescent assay (ELISA) IDEXX”. Mediante la metodología descrita por la empresa comercial.

5.7.4 Cuenta total de leucocitos

Se colectó una muestra de sangre de 5 ml directamente de la vena yugular en tubos que contenían EDTA (ácido tetraacético de etilendiamina), en los días -14, -9, -7, -2, 0, 5, 7, 14, 21, 28, 35, 37, y 44 de todos los lechones del experimento, con el objeto de realizar un conteo total de leucocitos, mediante la técnica de biometría hemática. Se considero como normal cuando el conteo total estaba dentro de un rango de 11,000 a 22,000 globulos blancos por mm^3 y una media de 18,000 leucocitos/ mm^3 (Coles, 2001; Taylor, 1999).

5.7.5 Prueba de RT-PCR.

Se obtuvieron muestras sanguíneas de 1 ml., directamente de la vena yugular en tubos que contenían EDTA, en forma periódica, desde el día -14, tomando estas muestras como básicas y posteriormente los días 0, 7, 14 y 28, para procesarlas y mediante la técnica de RT PCR anidada demostrar la presencia o ausencia de los ácidos nucleicos, de los virus de la fiebre porcina clásica (PAV-250) y del virus del síndrome respiratorio reproductivo porcino.

5.7.6 Lesiones macroscópicas

Al final del experimento y posterior al desafío de los lechones de todos los grupos con la cepa patógena AMES del virus de la fiebre porcina clásica, se procedió a realizar la necropsia a toda la mortalidad, con objeto de evaluar las lesiones macroscópicas de los pulmones por medio de la planimetría y las presentes en otros tejidos mediante observación de los cambios macroscópicos, finalmente se evaluaron estadísticamente

5.8 Análisis estadístico.

Los datos obtenidos de los diferentes parámetros del estudio; la evaluación clínica, registro de la temperatura, serología, cuenta total de los leucocitos, y las lesiones macroscópicas, fueron evaluados por medio de un análisis de varianza (ANOVA), para determinar diferencias entre las medias de los grupos, con un 95% de confianza. (Wayne y Daniel, 1991). Y para el análisis significativo, las medias de los grupos fueron probadas a través del método de comparación de medias Least-Significant-Diferences (LSD) para establecer diferencias significativas. Para este procedimiento se utilizo el programa computacional SPSS, con el cual se determinó si había una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de cerdos tratados.

6.0 Resultados

6.1 Signos clínicos.

Los lechones de los Grupos 1 y 3, no manifestaron signos clínicos aparentes los primeros 30 días; los lechones del Grupo 2; inoculados con el VPRRS el día cero, mostraron signos clínicos moderados de anorexia, apatía, postración, pelo hirsuto, conjuntivitis, respiración toracoabdominal, del día 3 al día 8, el Grupo 4, de los lechones inoculados con el virus del PRRS y la vacuna de la cepa PAV-250 en el mismo día (día cero), presentaron signos clínicos de leves a moderados de anorexia, apatía, postración, pelo hirsuto, conjuntivitis, respiración toracoabdominal, del día 4 al día 12, los Grupos 5 y 7, de los lechones vacunados con la cepa PAV-250, los días -14 y -7, no manifestaron signos clínicos aparentes, y en el día cero cuando se les aplicó la dosis del virus patógeno del PRRS, manifestaron signos clínicos ligeros de anorexia, apatía, postración, pelo hirsuto, conjuntivitis, respiración toracoabdominal, durante 4 días. Los lechones inoculados los días menos 7, y menos 14 con el virus del PRRS, de los grupos 6 y 8 respectivamente manifestaron signos clínicos leves de: anorexia, apatía, postración, pelo hirsuto; y a las 72 horas después del día cero cuando se les aplicó la vacuna con la cepa PAV-250 de la fiebre porcina clásica, manifestaron signos más evidentes de: Anorexia, apatía, postración, pelo hirsuto, conjuntivitis, disnea, polidipsia, y cianosis localizada en orejas y región oronasal ($p < 0.005$). Estos signos clínicos se mantuvieron durante 14 días y posteriormente fueron desapareciendo y solo se observó una reducción del crecimiento hasta el sacrificio. Los resultados que se observaron al desafiar con la cepa Ames de FPC el día 30, fueron los siguientes: a los Grupos que no fueron vacunados, el Grupo 1 control negativo y el Grupo 2, Control Positivo inoculado sólo con virus del PRRS respectivamente, fueron muriendo a partir de los días 18 y 7 días posdesafío, respectivamente, observando que los lechones inoculados con virus del PRRS murieron en un porcentaje del 80% a los 9 días, y el 20% de estos los 11 días posdesafío con el virus de la FPC, en los del Grupo 1 Control Negativo sin vacunación 3 cerdos murieron a los 16 días, y 2 a los 18 días posdesafío. Pero los grupos 3, 4, 5, 6, 7 y 8 a los 5 días posdesafío mostraron ligero aumento de temperatura, anorexia y polidipsia, posteriormente se recuperaron clínicamente y permanecieron vivos hasta el final del experimento a los 52 días, cuando se sacrificaron para realizarles la necropsia

Cuadro 2. Signos clínicos después de aplicar los respectivos tratamientos

Grupos/ cerdos	** Tratamientos	Signos clínicos días después de los tratamientos
1/5	Control negativo	Sin signos clínicos aparentes
2/5	Control vPRRS	Moderados: anorexia, apatía, postración, pelo hirsuto, conjuntivitis, respiración toracoabdominal del día 3 al día 8.
3/5	Control Vacuna FPC	Sin signos clínicos aparentes
4/5	Vac. FPC Día cero VPRRS Día cero	Moderados: anorexia, apatía, postración, pelo hirsuto, conjuntivitis, respiración toracoabdominal del día 4 al día 12.
5/5	vPRRS Día cero	Ligeros: anorexia, apatía, postración, pelo hirsuto, conjuntivitis, respiración toracoabdominal
	Vac. FPC Día -7	Sin signos clínicos aparentes
6/5	VPRRS Día -7	Moderados: anorexia, apatía, postración, pelo hirsuto, conjuntivitis, respiración toracoabdominal del día 3 al día 10.
	Vac. FPC día cero	Moderados: anorexia, apatía, postración, pelo hirsuto, conjuntivitis, disnea, polidipsia, ligera, cianosis de orejas y región oronasal, de día 4 al día 14.
7/5	VPRRS Día cero	Ligeros: anorexia, apatía, postración, pelo hirsuto, conjuntivitis, respiración toracoabdominal del día 4 al día 8
	Vac. FPC día -14	Sin signos clínicos aparentes
8/5	VPRRS Día -14	Ligeros: anorexia, apatía, postración, pelo hirsuto, conjuntivitis, respiración toracoabdominal, del día 3 al día 10
	Vac. FPC Día cero	Moderados: anorexia, apatía, postración, pelo hirsuto conjuntivitis, disnea, polidipsia, ligera, cianosis de orejas y región oronasal, de día 4 al día 18.

Cuadro 3. Nivel de signos clínicos de los 40 lechones de los 8 grupos

Variabes	Valores de la signología	Nivel de la signología	Número de grupo
Sin signos clínicos aparentes	(0)	(0)	1
Anorexia	(1)	(1), (2), (3),(4),(5),(6)	2
Apatía	(2)	(0)	3
Postración	(3)	(1), (2), (3),(4),(5),(6)	4
Pelo hirsuto	(4)	(1), (2), (3),(4),(5),(6)	5
Conjuntivitis	(5)	(1), (2), (3),(4),(5),(6),(7),(8)	6
Respiración toracoabdominal	(6)	(1), (2), (3),(4),(5),(6)	7
Polidipsia	(7)	(1), (2), (3),(4),(5),(6),(7),(8)	8
Cianosis	(8)		
		total	40

GRUPOS 1^a, 2^b, 3^a, 4^b, 5^b, 6^c, 7^b, 8^c.

Valores con distintas literales (superíndice) muestran significancia ($p < 0.005$).

6.2 Registro de la temperatura

Los resultados obtenidos de la temperatura corporal promedio de los lechones son los siguientes. En el Grupo 1, Control Negativo no mostró aumento de su temperatura corporal, EL Grupo 2 inoculado con VPRRS presentó una temperatura promedio de 39°C, En el Grupo 3, solo vacunado con PAV-250 de FPC no presento cambios en su temperatura corporal siendo una temperatura promedio de 39.2°C. En el grupo 4, vacunado con la cepa PAV-250 e inoculado con virus del PRRS ambos el día cero, presentaron una temperatura promedio de 39.2°C. Los Grupos 7 y 5 vacunados con la cepa PAV-250 de FPC los días -14 y -7 respectivamente, y posteriormente el día cero fueron inoculados con el VPRRS, presentaron una temperatura promedio de 39.23°C y 39.35°C respectivamente. Y los Grupos 8 y 6 inoculados con VPRRS en los días -14 y -7 y vacunados con la cepa PAV-250 de FPC el día cero, registraron temperaturas promedio de 39.35°C y 39.42°C respectivamente y en el análisis estadístico que se realizo no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) en sus valores.

(ver anexos, graficas del número 6 al 13)

6.3 Evaluación de leucocitos

Los resultados observados en el presente estudio en relación a los cambios que se presentaron en el conteo del total de los leucocitos, fueron encontradas diferencias estadísticas altamente significativas ($p < 0.001$).

El Grupo 1. Control no inoculado, se mantuvo dentro del rango de la cuenta promedio normal de leucocitos (11,000 a 22,000 leucocitos/mm³) (Coles, 2001) hasta el día 30 del experimento. Pero una semana después del desafío con la cepa AMES de FPC, se presentó una leucopenia de 6,970 leucocitos/mm³, en promedio el día 14 posdesafío se mantuvieron vivos los lechones con una leucopenia de 7,630 leucocitos/mm³, en promedio y finalmente murieron en los siguientes 4 días de este último muestreo.

En el Grupo 2, inoculado únicamente con VPRRS el día cero, para el día 14 posinoculación mostró una ligera leucocitosis de 22,360 leucocitos/mm³ en promedio; y después del desafío con la cepa Ames de fiebre porcina clásica, que se realizó en el día 30 se observó una leucopenia promedio de 8,538 leucocitos/mm³ a los 5 días posteriores.

En el Grupo 3, vacunados con la cepa PAV-250 contra la FPC, los promedios de leucocitos se mantuvieron siempre entre 13,030 y 20,340 leucocitos/mm³ (gráfica 1).

En el Grupo 4 vacunado contra la FPC e inoculado con VPRRS ambos el día cero, correspondiente al muestreo 5 de la gráfica No. 1, mostró una leucopenia a los 7 días después, de 10,120 leucocitos/mm³ posteriormente los lechones se recuperaron manteniendo sus niveles promedio de 16,330 a 18,240 leucocitos/mm³ hasta finalizar el experimento.

En el Grupo 5. vacunado contra la FPC el día - 7, e inoculado con VPRRS el día cero, se observó que al aplicar la vacuna contra FPC los cerdos mostraron a los 7 días una ligera leucopenia, promedio de 10,075 leucocitos/mm³. Y al inocular a los lechones el día cero con VPRRS, manifestaron una leucocitosis de 25,100 leucocitos/mm³, en promedio a los 7 días después. Y en las siguientes evaluaciones, se mantuvo con un rango entre 15,070 a 17,130 leucocitos/mm³, pero a partir de los siete días del desafío con el virus patógeno de la fiebre porcina clásica, cepa Ames nuevamente se presentó un aumento en la cuenta normal de 19,010 a 20,050 leucocitos/mm³, hasta finalizar el experimento (gráfica No. 1).

En el Grupo 6, inoculado con VPRRS el día - 7 presentó una baja leucocitaria de

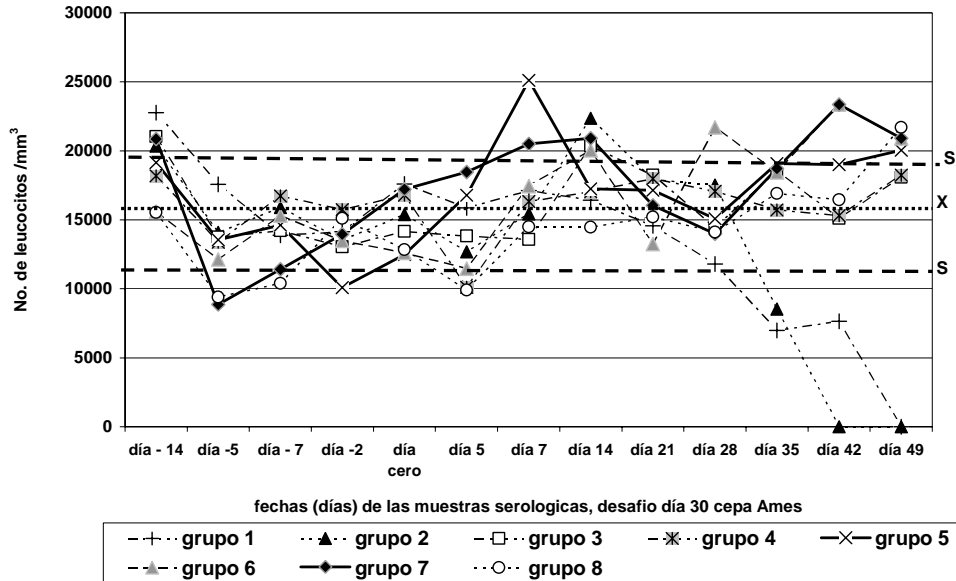
15,300 a 12,600 leucocitos/mm³, y después de aplicar la vacuna contra FPC, el día cero, la cuenta de leucocitos nuevamente bajo a 11,460 leucocitos/mm³ y posteriormente se mantuvo entre de 13,000 hasta 20,000 leucocitos/mm³, y ante el desafío con la cepa virulenta Ames, a los 7 y 14 días posdesafío aumento un promedio de 20,660 y 22,610 leucocitos/mm³ respectivamente (Ver Gráfica 1).

En el Grupo 7, vacunado contra FPC el día - 14 e inoculado con VPRRS el día cero, se observó una leucopenia promedio de 8,870 leucocitos/mm³ a los 5 días post aplicación de la vacuna contra la FPC; en los 14 días siguientes se recuperaron los parámetros normales y para el día cero cuando se inoculó el VPRRS, los niveles fueron en promedio de 20,510 leucocitos/mm³ observándose un aumento en el promedio del conteo total de leucocitos que fue de 20,920 en los siguientes muestreos; y a los 7 días después del desafío con la cepa virulenta Ames de la FPC hubo un recuento leucocitario promedio de 18,730 a 23,360 mostrando una ligera leucocitosis.

En el Grupo 8, inoculado con VPRRS el día - 14 y vacunado contra FPC, el día cero, los lechones mostraron una leucopenia promedio de 9,400 leucocitos/mm³ a los 5 días de la inoculación con el VPRRS. Posteriormente cuando se vacunaron contra la FPC, vuelven a mostrar una segunda leucopenia promedio de 9,900 leucocitos/mm³, a los 5 días posvacunación, y a los 7 días se recuperaron los niveles leucocitarios con un promedio de 14,490 leucocitos/mm³. Pero posterior al día 30 del experimento (correspondiente al día del desafío con el VFPC cepa Ames), a los 7 días se observó un aumento progresivo de 14,120 a 21,710 leucocitos/mm³, hasta finalizar el experimento (Gráfica 1).

GRÁFICA 1

Promedio leucocitario de los 8 grupos



GRUPOS 1^{ab}, 2^a, 3^{bcd}, 4^{bed}, 5^{cd}, 6^{cd}, 7^d, 8^{abc}. Desafío día 30 cepa Ames

Valores con distintas literales (superíndice) muestran significancia ($p < 0.001$).

Valor de la media de los grupos 15,332

Valor de la desviación estándar +/- 3,909

Grupo 1: Control.

Grupo 2: Inoculado con el virus del PRRS, el día cero.

Grupo 3: Vacunado contra FPC, el día cero.

Grupo 4: Vacunado contra FPC e inoculación con VPRRS, ambos el día cero.

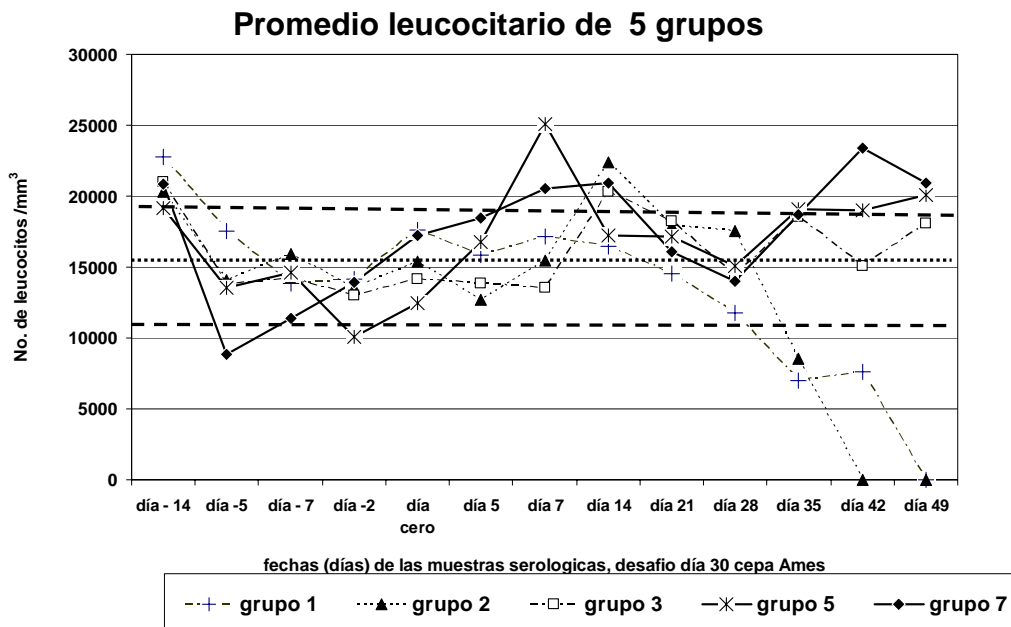
Grupo 5: Vacunado contra FPC, el día - 7 e inoculado con VPRRS el día cero.

Grupo 6: Inoculado con VPRRS el día - 7 y vacunado contra FPC, el día cero

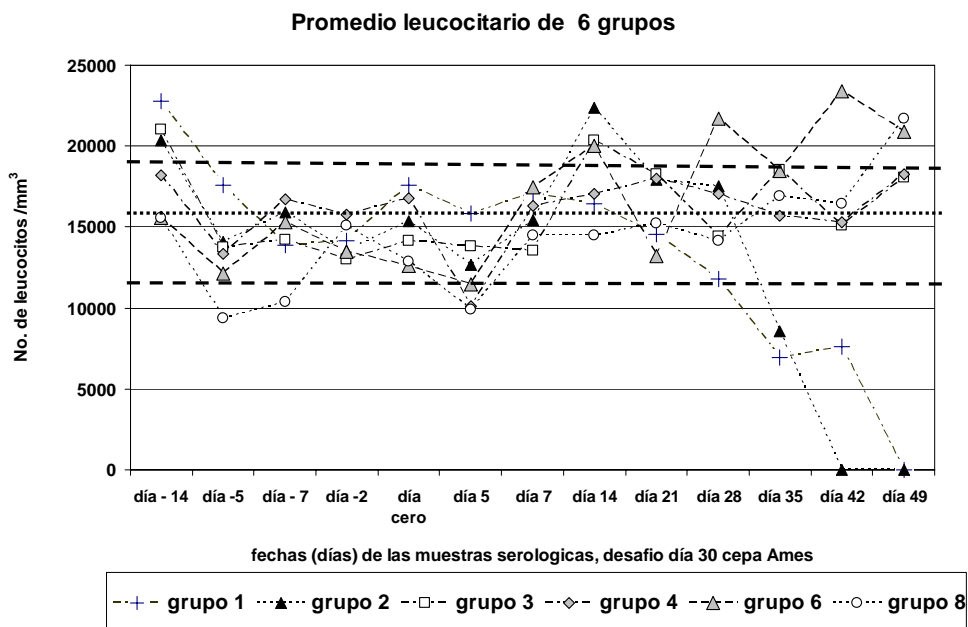
Grupo 7: Vacunado contra FPC, el día - 14 e inoculado con VPRRS el día cero.

Grupo 8: Inoculado con VPRRS el día - 14 y vacunado contra FPC, el día cero.

GRÁFICA 2



GRÁFICA 3



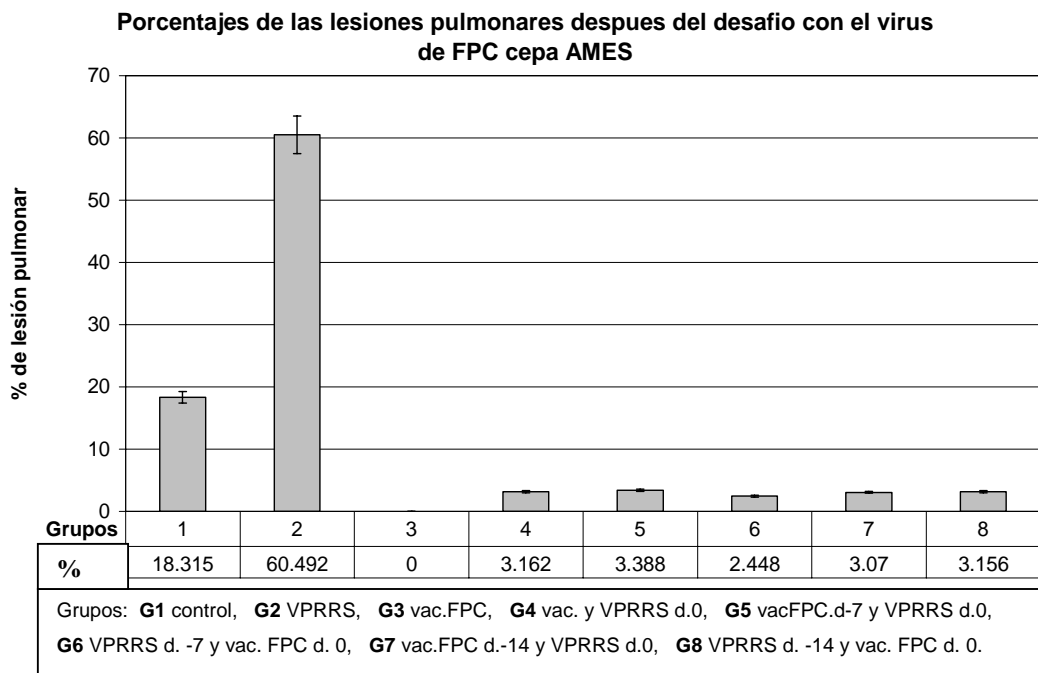
6.4 Evaluación de las lesiones macroscópicas

Los resultados de las lesiones macroscópicas de los pulmones, obtenidos mediante la técnica de planimetría, practicados en los lechones muertos y en los

sacrificados después de desafiarlos con la cepa Ames de fiebre porcina clásica (día 30 del experimento), y considerando la mortalidad durante los 20 días siguientes, o el sacrificio a esta fecha, correspondiente al día 52 del experimento, se les practicó la necropsia encontrando los siguientes resultados:

En el Grupo 1, Control Negativo, los lechones murieron entre los días 14 y 18 posdesafío con virus de la cepa Ames de la FPC, y presentaron un porcentaje de lesiones del 18.3 %; en el Grupo 2, inoculado con VPRRS el día cero, y con una mortalidad entre los días 9 y 11 posdesafío con virus Ames de la FPC, éste grupo mostró el porcentaje de lesión pulmonar más alto, siendo de un 60 %; los restantes 5 grupos se sacrificaron al finalizar el experimento: en el Grupo 3, sólo vacunado con la cepa PAV-250 de FPC, se sacrificaron al finalizar el experimento día 52 y no mostró lesión alguna; y para los Grupos 4,5,7 y 8, el porcentaje de lesiones fue similar siendo estos en promedio de 3.16 %, para el Grupo 6 se obtuvo un porcentaje de 2.45 % de lesiones. Los resultados observados de lesiones medidas mediante la planimetría para los siete grupos tratados presentaron diferencias altamente significativas estadísticamente ($p < 0.001$) entre el Grupo 2, y los otros Grupos del experimento (Gráfica 2).

GRÁFICA 4



6.5 Evaluación serológica mediante la técnica de ELISA

Nivel de anticuerpos contra la fiebre porcina clásica.

Respecto a los resultados obtenidos durante la evaluación serológica de todos los lechones de los grupos vacunados con la cepa PAV- 250 de fiebre porcina clásica evaluados mediante la técnica de ELISA, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, se consideró como positivo un porcentaje de bloqueo mayor o igual al 40%, y una muestra negativa (no contiene anticuerpos) si da un porcentaje de bloqueo menor o igual a 30%, y dudoso si el rango se presenta entre 30% y 40%. En la presente investigación se detectaron anticuerpos a partir del día 14 postvacunación contra la fiebre porcina clásica.

Los Grupos 1 y 2, Control Negativo y Control infectado con virus del PRRS respectivamente resultaron negativos. El Grupo 3, presento una respuesta positiva a partir del día 7 posvacunación de 52.4% y para el día 14 un porcentaje de bloqueo de 76% y se mantuvo constante hasta después del desafío con FPC cepa AMES 70% (gráfica 5).

El Grupo 4, mostró resultados similares al Grupo 3, 71% a los 14 días posvacunación y se mantuvo constante en el rango de 67% a 73% después del desafío de FPC,

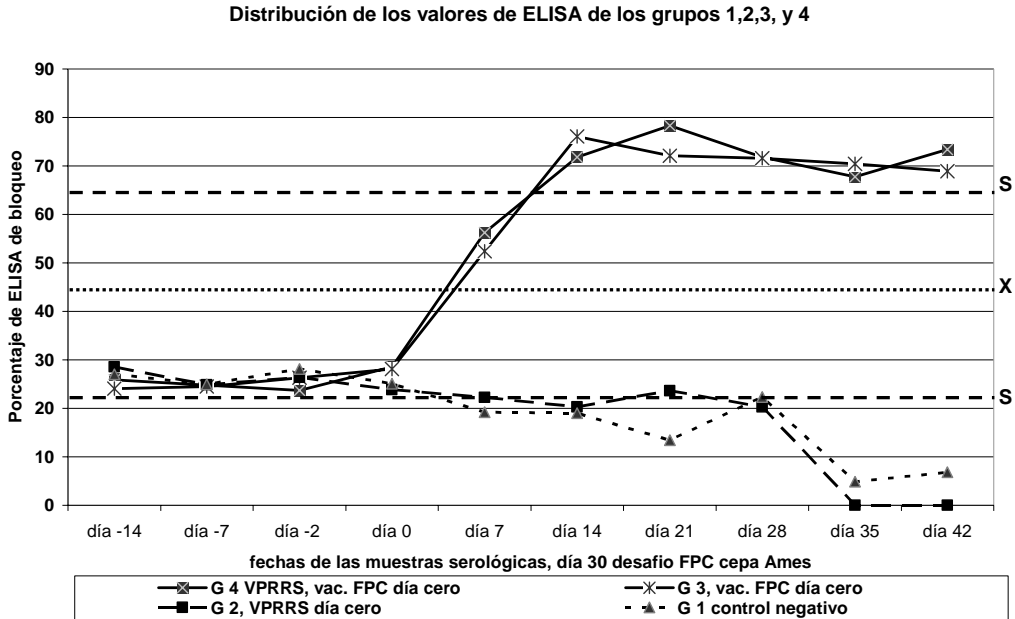
Los Grupos 7 y 5, vacunados contra fiebre porcina clásica a los -14 y -7, respectivamente, mostraron una respuesta positiva a los 7 días posvacunación, con 64% y 56% respectivamente, y la inoculación del virus PRRS no provocó disminución alguna. Pero a los siguientes 14 días, ambos grupos se mantuvieron en un rango de 73 y 72%; y el desafiarlos con la cepa virulenta Ames de fiebre porcina clásica, aumentaron en un rango de 85 a 80% respectivamente (gráfica 6).

Los Grupos 8 y 6, inoculados con virus PRRS a los -14 y -7 respectivamente y cuando se vacunaron con la cepa PAV-250 de fiebre porcina clásica en el día cero dieron un resultado negativo a los 7 días posvacunación 27.8% y 23.5% respectivamente, y se detecto una respuesta positiva a los 21 días posvacunación de 60% y 62% respectivamente (gráfica 7).

Después de el desafío con la cepa virulenta Ames presentaron un aumento de 73% y 74% respectivamente Los resultados observados en el nivel de anticuerpos para los siete grupos tratados presentaron diferencias estadísticas altamente significativas ($p < 0.001$). (Graficas 5, 6, y 7).

GRÁFICA 5

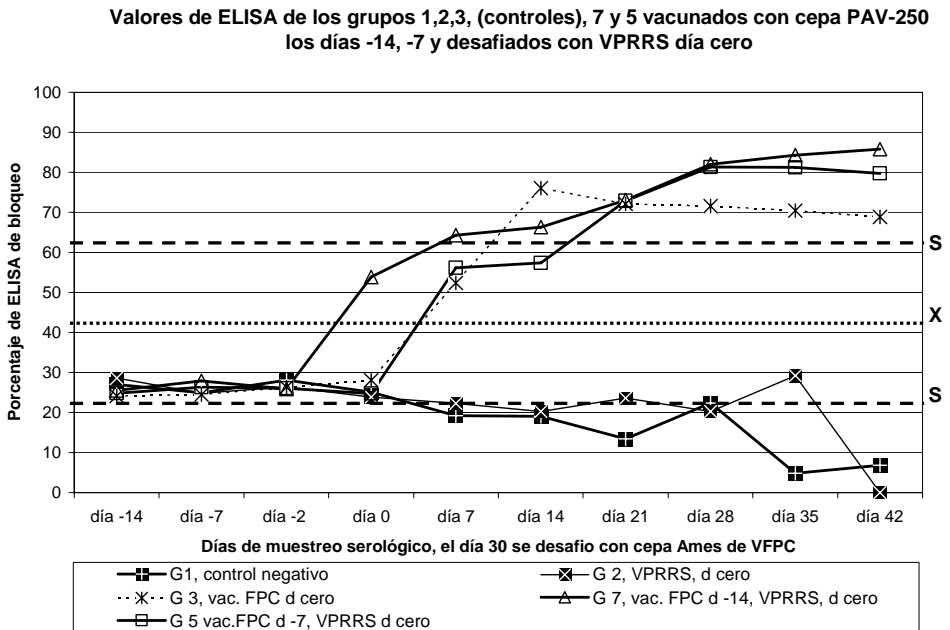
Nivel de anticuerpos contra el virus de la fiebre porcina clásica determinados por ELISA de Bloqueo (*)



(*) Se consideró un suero positivo con un porcentaje de bloqueo de 40% o más

GRÁFICA 6

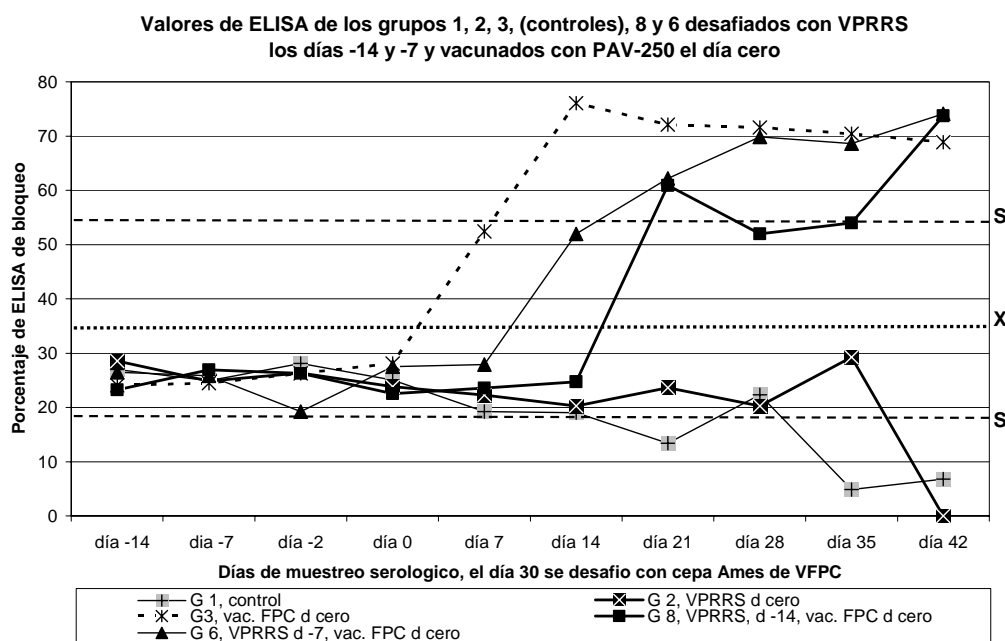
Nivel de anticuerpos contra el virus de la Fiebre porcina Clásica determinados por ELISA de bloqueo (*)



(*) Se consideró un suero positivo con un porcentaje de bloqueo de 40% o más

GRÁFICA 7

Nivel de anticuerpos contra el virus de la fiebre porcina clásica determinados por ELISA de bloqueo (*)



(*) Se considero un suero positivo con un porcentaje de bloqueo de 40% o más

6.6 Determinación de virus de FPC y de PRRS mediante PCR

Identificación viral mediante RT- PCR Anidada. La presencia de los ácidos nucleicos del virus de la fiebre porcina clásica y del virus del síndrome respiratorio reproductivo porcino se realizó mediante la técnica molecular de RT-PCR anidada y los resultados fueron los siguientes:

Los resultados obtenidos para comprobar la presencia de los ácidos nucleicos del virus vacunal cepa PAV-250 de la FPC fueron negativos en todos los Grupos trabajados del Grupo 1 al Grupo 8.

Los resultados que determinaron la presencia del VPRRS mediante la RT – PCR anidada, fueron los siguientes: resultaron negativos los Grupos 1 y 3, que fueron el Grupo Control y Grupo vacunado con la cepa PAV-250 de FPC, respectivamente. Y los grupos 2, 4, 5, 6, 7, y 8 que fueron inoculados con el virus PRRS, de acuerdo al diseño experimental, resultaron positivos

7.0 Discusión

Los lechones infectados con el virus del PRRS presentan cambios patológicos en sus órganos, tejidos y células. Esto se ve reflejado mediante la presencia de signos clínicos que modifican su comportamiento para una producción óptima, manifestando una enfermedad crónica. Situación que se agrava cuando este virus interacciona con el virus de la fiebre porcina clásica. Donde se observa una mayor intensidad de las manifestaciones clínicas que podrían ser consecuencia del daño que ocasionan estos virus al sistema inmune celular, ambos se replican en los macrófagos alveolares e intravasculares, situación que compromete la defensa del sistema respiratorio (Fraile, 2004; Suradhat, et. al 2006)

7.1 Signos clínicos

En el presente estudio se observaron signos clínicos, de leves a moderados tales como la anorexia, apatía, postración, pelo hirsuto, tristeza, decaimiento, conjuntivitis, disnea, polidipsia, ligera, cianosis de orejas y región oronasal. signos similares a los reportados (Thacker y Halbur, 1999; Pineda et al., 2002; Fraile, 2004) en infecciones mixtas por PRRS y sus interacciones. Los grupos 1 y 3, que fueron el control y el vacunado sólo con la cepa PAV -250 de FPC respectivamente, no presentaron signos clínicos aparentes.

En los grupos 7 y 5 vacunados con esta misma cepa PAV-250 en los días -14 y -7 respectivamente, tampoco presentaron signos clínicos aparentes posvacunación. Los grupos que se les inoculó el virus del PRRS, grupos 2, 4, 5, 6, 7 y 8 presentaron anorexia, apatía, postración, pelo hirsuto, de leves a moderados, pero en los lechones de los Grupos 8 y 6 inoculados con el vPRRS, el día -14 y -7 respectivamente, presentaron signos leves de: anorexia, apatía, postración y pelo hirsuto. Y cuando a estos lechones se les aplicó la vacuna de FPC cepa PAV-250 en el día cero, presentaron signos más notorios de: anorexia, apatía, postración, pelo hirsuto y también manifestaron signos clínicos respiratorios tales como disnea, y tos, acompañados con tristeza, debilidad, conjuntivitis, y cianosis localizada en orejas y región oronasal; estos signos clínicos se mantuvieron durante 5 días y posteriormente fueron desapareciendo y en los lechones más afectados (60%) se observó una pérdida de peso y una reducción del crecimiento hasta el momento del sacrificio. Esto posiblemente se debió a que el virus del PRRS inicialmente infecta las células de la línea celular del monocito/macrófago

intravasculares y alveolares, donde se multiplica el virus y provoca daños (Molitor *et al.*, 1997; Thanawongnuwech *et al.*, 1997, 1998). Y posteriormente cuando se aplica la vacuna contra la fiebre porcina clásica, este último virus utilizará los macrófagos que todavía se conservan para su replicación (Mogollón *et al.*, 2006). Esto trae como consecuencia un aumento marcado de signos clínicos y cambios patológicos en estos lechones.

7.2 Evaluación de leucocitos

Los resultados que muestran los cambios en las células leucocitarias de este experimento, demuestran una ligera leucopenia promedio a los 5 días, en los grupos donde se aplicó la vacuna de fiebre porcina clásica, así mismo en los grupos que se inocularon con el virus del síndrome respiratorio reproductivo porcino. Resultados similares fueron reportados por Nielsen y Betner, 1997; Feng *et al.*, 2001 y Ramírez *et al.*, 2006. donde mencionan una leucopenia de los 3 a los 7 días posinoculación con el virus de la fiebre porcina clásica. Se observó que los grupos 7 y 5 vacunados con la cepa de FPC los días menos 14 y menos 7 e inoculados con el VPRRS el día cero, mostraron una leucopenia promedio de 8,870 y 10,075 leucocitos /mm³ respectivamente, a los 5 días de ser vacunados con FPC. Pero cuando se les inoculó el virus PRRS el día cero, a los 7 días después mostraron una leucocitosis promedio de 12,490 a 25,100 leucocitos/ mm³ en el Grupo 5, y un aumento de 17,220 (día cero) a 20,920 (día 21) leucocitos/mm³ en el Grupo 7.

En los Grupos 8 y 6, que fueron inoculados con VPRRS los días menos 14 y menos 7 respectivamente y vacunados con la cepa PAV-250 de FPC el día cero, 4 cerdos del Grupo 8, mostraron una leucopenia a los 5 días de la inoculación con el VPRRS con un promedio leucocitario de 9,400 leucocitos /mm³ y en el Grupo 6 en un cerdo hubo ligera leucopenia a los 5 días posinoculación con el VPRRS, y cuando se vacunaron con la cepa PAV-250 de FPC nuevamente mostraron una ligera disminución: en el Grupo 6 de 12,600 a 11,400 leucocitos /mm³; y una leucopenia en el Grupo 8 que bajó de 12,845 a 9,900 leucocitos /mm³ en promedio. Posteriormente, después de desafiar a los lechones con virus patógeno de la cepa Ames de fiebre porcina clásica, los del Grupo 8 mostraron un aumento en el número de leucocitos pero un poco más del rango normal ya que subió de 14,490 a 21,710 leucocitos /mm³ en promedio, y en el Grupo 6 permaneció normal. El aumento en el número de leucocitos después de la leucopenia y

posteriormente al desafío con la cepa Ames de FPC, favorece la recuperación de los lechones por el incremento de los leucocitos (Martínez *et al.*, 1999).

En este trabajo se demuestra que los cerdos inoculados con el virus del PRRS y posteriormente al ser vacunados con la cepa PAV-250 de la FPC, producen reducción del número de glóbulos blancos, lo que seguramente ocasiona una reducción considerable al efecto de fagocitosis, y un efecto negativo a la respuesta inmune, esto manifiesta los posibles cambios clínicos patológicos que provocan una pérdida en la producción porcina

7.3 Identificación viral mediante RT- PCR

La presencia de los ácidos nucleicos del virus de la fiebre porcina clásica y del virus del síndrome respiratorio reproductivo porcino, se investigó mediante la técnica molecular de RT-PCR anidada. En la evaluación mediante ésta técnica molecular para todos los grupos trabajados en éste estudio presentaron un resultado negativo a la presencia de los ácidos nucleicos del virus de la FPC.

Los resultados que determinaron la presencia de los ácidos nucleicos del virus del PRRS mediante la RT – PCR anidada fueron los siguientes: resultaron negativos el Grupo 1 y el Grupo 3, que fueron el Grupo Control Negativo y el Grupo vacunado con la vacuna de FPC respectivamente; y los Grupos 2, 4, 5, 6, 7 y 8, que todos fueron inoculados con virus PRRS de acuerdo al diseño experimental, resultaron positivos; resultados similares fueron reportados por (Singh *et. al.*; 2005; Chen *et. al.*, 2008; Lurchachaiwong *et. al.*, 2008) al realizar estudios con técnicas moleculares sobre el diagnóstico de la FPC y VPRRS.

7.4 Perfil de anticuerpos contra la FPC evaluados mediante un kit comercial de ELISA.

Analizando los resultados se observó lo siguiente:

El Grupo 1 Control y el Grupo 2, infectado con virus del PRRS, resultaron negativos a los anticuerpos contra virus de la fiebre porcina clásica , ya que en el primer análisis presentaron 19% y 22% de bloqueo respectivamente, y así se mantuvieron durante todo el experimento en los 10 muestreos analizados mediante ELISA de bloqueo. Estos lechones murieron después del desafío con la cepa virulenta Ames entre los 9 y 20 días posdesafío. Observándose que los lechones del Grupo 2, inoculado sólo

con virus PRRS, el 80% murieron el día 9 y el otro 20% para el día 11 posinoculación. Mientras que los lechones del Grupo 1 Control, murieron más tarde, entre los 14 y los 20 días posdesafío con la cepa virulenta Ames.

El Grupo 3, vacunado con la cepa PAV-250 de FPC, presentó una respuesta serológica positiva a partir del día 7 posvacunación con un 52.4% de bloqueo y se mantuvo constante con aproximadamente un 76% de bloqueo, desde el día 21 hasta después del desafío con la cepa virulenta AMES de FPC.

Los Grupos, 7 y 5 vacunados contra fiebre porcina clásica los días, -14 y -7, respectivamente, tuvieron un comportamiento similar, con una respuesta positiva de anticuerpos contra la FPC a los 7 días posvacunación con 56% y 53% de bloqueo, respectivamente y la inoculación de el virus PRRS no provocó disminución alguna de los anticuerpos, pero a los siguientes 14 días ambos grupos se mantuvieron en un rango de 82 a 85% de bloqueo, y el desafiarlos con la cepa virulenta Ames de fiebre porcina clásica no les afectó y se mantuvieron constantes en ese porcentaje (gráfica 4).

Los Grupos, 8 y 6, inoculados con virus PRRS los días -14 y -7 respectivamente y posteriormente vacunados con la cepa vacunal PAV-250 de FPC el día 0, dando resultados positivos a los 21 días posvacunación con 62% y 60% de bloqueo, respectivamente; después del desafío con la cepa virulenta Ames presentaron un aumento llegando al 84% y 79% de bloqueo respectivamente (gráfica 5).

El presente estudio demuestra que los lechones con una infección primaria del virus del síndrome respiratorio reproductivo porcino antes y después de la vacunación contra la fiebre porcina clásica con la cepa PAV-250, no ocasiona una baja significativa en la respuesta de anticuerpos contra esta cepa vacunal. Y también demuestran que los lechones vacunados con PAV-250 y desafiados con la cepa virulenta Ames, no presentaron signos clínicos ni mortalidad alguna durante los 22 días siguientes al desafío. Contrario a lo observado por otros investigadores que mencionan en sus estudios que la infección del virus PRRS suprime la respuesta de anticuerpos ante la vacunación contra el virus de la fiebre porcina clásica con la cepa China, y lo mismo que otro estudio al utilizar la vacuna de virus vivo modificado, producida en cultivo celular (Li y Yang., 2003; Mogollón et al., 2006)

En los lechones que recibieron primeramente la vacuna PAV-250, y después fueron inoculados con el virus del PRRS presentaron el porcentaje de bloqueo más alto, 86%. Comparado con los lechones que primeramente se inocularon con el virus del PRRS y

después la vacuna con cepa PAV-250, y que presentaron un porcentaje de bloqueo del 79%.

En los lechones del Grupo 2, a los que se les inoculó con el virus del PRRS y posteriormente el día 30 del experimento fueron desafiados con la cepa virulenta Ames, se observó un aumento en la presencia de los signos clínicos de la fiebre porcina clásica así como de los cambios y lesiones a la necopsia ante la infección con el virus de FPC; una investigación semejante fue comunicada por Depner *et al.*, (1999).

En un documento publicado por Suradhat *et al.*, en (2006) se mencionan las propiedades inmunomoduladoras que tiene el VPRRS, cuando interactúa con otros virus e inhibe la respuesta inmune del cerdo, cuando se aplica la vacuna contra la FPC. Estando ya infectados los cerdos con VPRRS se presenta una falla en la producción de anticuerpos protectores (Li. y Yang, 2003). Situación contraria a lo reportado, en este estudio ya que no se presentó falla en la producción de anticuerpos. Posiblemente esto sea debido a la vacunación con una cepa diferente a la utilizada en este estudio, así como por las características de la cepa vacunal PAV-250 de fiebre porcina clásica y debido a que se utilizaron cerdos SPF.

8.0 Conclusiones

Los lechones infectados con el virus PRRS, y después vacunados con la cepa PAV-250 contra la FPC, presentan cambios clínicos y respiratorios, ligera leucopenia en el conteo total de leucocitos, no se afectó la respuesta de anticuerpos protectores contra la FPC, y presentaron un porcentaje mínimo de lesiones pulmonares macroscópicas. Por otro lado el porcentaje de lesiones pulmonares fue alto cuando no fueron vacunados con esta cepa vacunal y fueron desafiados con el virus patógeno de FPC.

El 80% de los lechones vacunados con la cepa PAV-250 presentaron una leve leucopenia posvacunación y aquellos que fueron posteriormente inoculados con el virus del PRRS, presentaron ligera leucocitosis posinoculación, y posteriormente al ser desafiados con la cepa virulenta Ames presentaron otro aumento en el conteo de leucocitos. Los lechones que fueron inoculados con VPRRS al día -7 y que al día 0 fueron vacunados con la cepa PAV-250, sólo mostraron ligera leucopenia de 9,050 y 7,950 glóbulos blancos por mm^3 , posvacunación; y no hubo cambios marcados posdesafío con el VFPC.

Los lechones que primeramente fueron inoculados con el virus del PRRS (los días

menos 14 y menos 7) presentaron una leve leucopenia (15,546 a 9400 leucocitos/mm³) y cuando se vacunaron con la cepa PAV-250, nuevamente presentaron ligera leucopenia (12845 a 9900 leucocitos/mm³). Así mismo posterior al desafío con la cepa virulenta Ames no bajaron el conteo de leucocitos.

Los lechones vacunados con la cepa PAV-250, antes o después de la inoculación con el virus del PRRS y desafiados con la cepa virulenta Ames, presentaron mínimos (3%) porcentajes de lesiones pulmonares. No así los controles no vacunados que alcanzaron hasta un 18%. Pero los no vacunados contra la FPC y que fueron infectados con el virus del PRRS y después de que fueron expuestos con la cepa virulenta Ames de FPC, presentaron un porcentaje alto de lesión pulmonar (60%).

En base a los datos obtenidos en este estudio se demostró que la infección con el virus del PRRS en lechones SPF, antes o después de la vacunación con la cepa PAV-250 contra la FPC, no afectó la respuesta de anticuerpos estimulada por la cepa vacunal, y al desafiarlos con la cepa virulenta Ames presentaron un 0% de morbilidad y mortalidad.

En los lechones controles, sin anticuerpos contra la fiebre porcina clásica, que fueron infectados con el virus del PRRS, al ser infectados con la cepa virulenta de FPC se potencializaron los cambios clínico patológicos de la FPC y murieron en promedio de 6 a 7 días posinfección.

Los lechones controles no vacunados con la cepa PAV-250, e infectados con 10² de la cepa Ames de FPC, pudieron mantenerse vivos hasta por 22 días posinfección.

Se demostró en cerdos SPF que la vacuna contra la fiebre porcina clásica, cepa PAV-250 es una vacuna adecuada, de buena calidad y confiable, para seguir siendo usada en el control y erradicación de la FPC en zonas enzoóticas, y en presencia de virus del síndrome respiratorio reproductivo porcino.

Es necesario complementar estos estudios con cerdos comerciales que no sean SPF, para comparar los resultados.

9.0 Bibliografía

Arias, M., Barceló, J., Muñoz, A. y Sánchez – Vizcaíno., 2003. Citado en Curso digital de enfermedades infecciosas Porcinas. Síndrome Respiratorio Reproductivo. www.sanidadanimal.info Madrid España.

Benfiel, D.A., Nelson, E., Collins, J.E., Harris, L., Goyal, S.M., Robinson, D., Christianson, W.T., 1999. Characterization of Swine infertility and Respiratory Syndrome. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 4,127-133

Blaha, T. 2000. The “Colorful” epidemiology of PRRS. *Vet. Res.* 31:77 – 83.

Carbrey, E. A. 1986. Cólera Porcino. En: *Enfermedades Exóticas de los Animales. Su prevención, diagnóstico, y control.* Comité de enfermedades exóticas de la Asociación de Sanidad Animal de los Estados Unidos. Publicado por la Comisión México-Americana para la prevención de la fiebre aftosa. México D.F., p.9-12.

Chen HT, Zhang J, Ma LN, Ma YP, Ding YZ, Liu XT, Chen L, Ma LQ, Zhang YG, Liu YS. 2008. Rapid pre-clinical detection of classical swine fever by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *J Virol Methods*;149(2):264-8.

Ciprian, C. A. y Mendoza, E. S. 2001. Complejo Respiratorio Porcino. En: *Memorias del 3er. Ciclo Nacional de Enfermedades Respiratorias del Cerdo.* Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. p. 5 – 21.

Coles E. H., 2001. *Diagnóstico y Patología en Veterinaria.* Ed. Interamericana. P. 56-89

Correa, G., P., Backer, J., A., Sheffy, B., E., Ochoa, M., Mancisidor, A., N.,: 1975^a. Una nueva vacuna para erradicar el Cólera porcino. *Técnica Pecuaria en México.* Pp. 34-40.

Correa, G. P., Coba, A., M.A., Anaya, E. A. M.: 1992^b. Experiencias con la vacuna contra la fiebre porcina clásica (FPC) PAV-250 de virus vivo atenuado En: *Symposium Sobre Enfermedades del Cerdo.* p 90-99, México.

Correa, G. P. 1981. Cólera porcino. En: *Enfermedades Virales de los Animales Domésticos Monogástricos.* Vol. 1, 4^a. Ed., Editorial FH. México. p.7-28.

Correa, G. P., Coba, A. M, Weimersheimer, J., Anaya, E. A. M., Millian, F., Canto, J. 1994^c. Presence of antibodies against pig abortion and respiratory Syndrome (PEARS) in imported and native pigs from several areas of México. The 13th International Pig Veterinary Society Congress. Bangkok, Thailand.

Depner K. R., E. Lange, S. Pontrakulpipat, and D. Fiehtner. 1999. Does porcine reproductive and respiratory syndrome virus potentiate classical swine fever virus infection in weaner pigs?. *Zentralbl Veterinarmed B* 46:485-491.

Díaz, E.E. 2003. *Fundamentos de PRRSv (Virus del Síndrome Respiratorio Reproductivo Porcino).* El Uso de la Vacuna para el Control del Virus de PRRS. Boehringer Ingelheim Vetmedica. Memorias de AMVEC Guadalajara J. 166-176.

ELISA: 1996. Tips Técnicos: Flock Chek, Memorias del Curso de Actualización en Técnicas de Inmunoensayo aplicadas al diagnóstico de enfermedades de los animales. México.

Estrada, S. E., Gonzalez, Vega. D., Arriaga, E. C., Ávila, S. E., Hernández, A. y Morilla, A. 1998. Risk factors that increase the numbers of outbreaks of classical swine fever in the control area of México. OIE. Symposium on Classical Swine Fever (Hog Cholera). Birmingham (UK). p. 19, 9-10.

Feng W. H., S. M. Laster, M. Tomkins, T. Brown, J.S.Xu, C. Altier, W. Gomez, D. Banfield, and M.B. McCaw. 2001. In utero infection by porcine reproductive and respiratory syndrome virus is sufficient to increase susceptibility of piglets to challenge by *Streptococcus suis* type II. *J Virol* 75, 4889-4895.

Fraile, S. L. 2004. Neumonía vírica producida por el virus del Síndrome Reproductivo Respiratorio Porcino Ed. Lleida . www.Exopol.com .

Flock-Chek.1996. Memorias del Curso de Actualización En: Técnicas de Inmunoensayo (ELISA). Aplicadas al diagnóstico de enfermedades de los animales. Tips Técnicos. p.8-10.

Holland, J. 1995 Replication error quasispecies population, and extreme evolution rates of RNA virus. En *Emerging viruses*. Ed. S.S. Morse. New York. Oxford University Press, 218-302.

Iglesias, S. G., Trujano, C. M. 2000. Diversos modelos de interacción que ocurren en el complejo respiratorio porcino. *Vet. Mex.* 31 (1): 59-65.

Kim.B.H.; Cho, C.H.; Park, N.C. and Kwon, H. I.1998. Prevalence and factors associated with Hog Cholera (CSF) outbreaks in South Eastern Korea in 1996. En : *procc. Of the 15 IPVS Congress*. Birmingham, Inglaterra. Julio 15 al 19, 353.

Kosmidou, A. , Büttner M. And Meyers G.1998. Isolation and characterization of cytopathogenic classical swine fever virus (CSFV). *Arch. Virol.*143:1295–1309.

Laevens,H., Koenen, F., Deluyker, H., Berwens, D., and Dekreif, A.1998. An experimental infection with CSFV in weaner pigs. Transmission of the virus course of the disease and antibody response En: *Procc. of the 15th IPVSCongress*. Birmingham. Inglaterra. p.189,

Lager, K.M., Mengeling, W.L. and Wesley, R.D. 2002. Evidence of local spread of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus, *Swine Health and Production*, 4:167-170.

Li, H. and H. Yang. 2003. Infection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus suppresses the antibody response to classical swine fever virus vaccination. [Vet Microbiol.](http://www.vetmicrobiol.com) Sep 24;95(4):295-301.

Lozada, D.A., Morilla. G.A. 2002. Estudio Epidemiológico de Fiebre Porcina Clásica en dos Zonas Porcícolas del Altiplano Mexicano. Tesis de Maestría. UAT.

Lurchachaiwong W, Payungporn S, Srisatidnarakul U, Mungkundar C, Theamboonlers A, Poovorawan Y. 2008. Rapid detection and strain identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) by real-time RT-PCR. *Lett Appl Microbiol.*; 46(1):55-60.

Martínez, S. A., M. I. Cisneros, V. D. González, D. C. Arriaga, y G. A. Morilla. 1999. Changes in leucocyte and lymphocyte subpopulations of pigs that survived classical swine fever virus challenge. *Téc. Pecu. Méx.* INIFAP. www.tecnicapecuaria.org.mx/index

Mendoza, E. S. y Ciprian, C. A. 2001.PRRS. En Memorias del 111 Ciclo Nacional de Enfermedades Respiratorias del Cerdo. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. 161 – 164

Mendoza, E. S, Ciprián, C. A y Hernández, B. E..1995. Fiebre Porcina Clásica: Investigación actual y perspectivas de desarrollo tecnológico aplicado al diagnóstico serológico. Tesis Doctoral, Microbiología. FES-C, UNAM.

Mogollón D.J., A. M. Rincon, Z. Sabogal, y de la Rosa Z. 2006 Interacción entre los virus del PRRS y FPC y su efecto en la reproducción: Instituto Colombiano Agropecuario. Colombia Bogotá

Molina, P. U., Medina T. F. 1998. Importancia económica de la Erradicación de la Fiebre Porcina Clásica en el estado de Yucatan. En: Fiebre porcina en las Americas.Ed. Morilla G. A.Puebla. México.

Molitor T., W., E. M. Bautista, C. S. Choi. 1997. Immunity to PRRSV : Double-edged sword. *Vet. Microbiol.* 55:265-276

Morilla, G. A. 1993. Inmunología veterinaria, Editorial Diana, México

Morilla, G.A.1997. Fiebre Porcina Clásica. En: Manual para el control de las Enfermedades Infecciosas de los cerdos. Editado por INIFAP-SAGARPA y el PAIPEME, A. C. México, D. F.. 91-108 y 207 a 218.

Morilla, G.A. 1998. Control de la Fiebre Porcina Clásica por medio de la vacunación.En: La Fiebre Porcina Clásica en las Americas. Simposio Internacional. Puebla México.

Nielsen, J., A. Botner.: 1997. Hematological and Immunological parameters of 41/2 month old pigs infected with PRRS virus. *Vet. Microbiol* 55, 289-294.

Palomo, Y., A. 2006. Estrategias de Control de la Fiebre Porcina Clásica. *Microbiol. Vet.* 06: 272-278

Patterson R., S. Younger, W.O. Weigle & F.J. Doxon: 1962. Antibody production and transfer to egg yolk in chickens. *J. Immunol.* 89: 272-278.

Pineda S. G.; Gonzalez A. L.; y Amescua Z. S. 2002. Interacción de la vacunación de la Fiebre Porcina Clásica en relación con el Síndrome Respiratorio Reproductivo Porcino (PRRS), En: *Memorias de AMVEC*. Puerto Vallarta México.

Ramírez E., A. Ruíz, A. Islas, C. Lecocq, L. Carrasco, y M. Quezada. 2006. Características hematológicas y patológicas de cerdos inoculados experimentalmente con el aislado chileno del virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino. *Arch. Med. Vet.* 38, No. 2.

Ramírez, N. R. y Reynoso, G. M. 1995. Manual de actualización técnica para la aprobación de Médicos Veterinarios en el Control y Erradicación de la Fiebre Porcina Clásica. SAGDR. México. p. 12-16.

Romero, N.M. 1998. Diagnóstico de laboratorio de la Peste Porcina Clásica. En: *Tratado del ganado porcino aula veterinaria No.47*. Centro de investigaciones en salud animal. Valdeolmos-Madrid. España. p. 53-67.

SAGARPA. 2001. [http:// www. Sagar.gob.mx/Conasag/proyrevfpc.htm](http://www.Sagar.gob.mx/Conasag/proyrevfpc.htm),

Sánchez-Vizcaíno; J. M. 2004. Curso de introducción a la inmunología porcina, 2da. Edición, Universidad Complutense de Madrid, España.

Sánchez-Vizcaíno, Arias, M., 2003. Enfermedades infecciosas porcinas. Síndrome Respiratorio Reproductivo Porcino. Universidad Complutense de Madrid. España.

Segales, J. 2000. Potenciación de enfermedades bacterianas por la infección con el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino: verdad o Ficción?. *Memorias del Simposium Internacional sobre Enfermedades Emergentes del Cerdo*, Irapuato Guanajuato, México. Academia Veterinaria Mexicana A.C.

Singh, V.K., Sai Kumar . G. and Paliwal. O.P. 2005. Detection of classical swine fever virus in archival formalin-fixed tissues by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Research in Veterinary Science*, Volume 79, Issue 1, Pages 81-84

Socci, E.G, González, V.D. 1998. Prueba de ELISA para detectar antígeno del virus de la Fiebre Porcina Clásica. En: *Fiebre Porcina Clásica en las Americas*. Editado por Morilla. Ediciones Comunicación Gráfica y Representaciones P. J. S. A. de C. V. Puebla Mex. P. 389-394.

Suarez, P. 2000. Ultraestructural patogénesis of the PRRS virus. *Vet. Res.* 31(1): 47 – 55.

Summerfield, A., Knötig, S.M. and Mc Culloug, K. C. 1998. Lymphocyte apoptosis during classical swine fever. Implication of activation – induced cell death. *J.virol.* 72(3): 1853 – 1861.

Suradhat, Kesdangsakonwut S., W. Sada, S. Buranapradittkun, S. Wongsawang, and R. Thanawongnuwech. 2006. Negative impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection on the efficacy of classical swine fever. *Vaccine.* 24(14):2634-42..16406169 sanipa.s@chula.ac.th.

Taylor D. J. 1999. *Pig Diseases*. Seventh edition. .St Edmundesbury Press Ltd. Bury Edmunds Suffolk. .ISBN 09506932 6 X. p61 – 69.

Thacker, E.L.; Halbur, P.G. 1999. *Mycoplasma hyopneumoniae* Potentiation of porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus-Induced Pneumonia. *Journal of Clinical Microbiology.*, p 620-627, vol. 37. No.3

Thanawongnuwech, R., E. L. Thacker, P. G. Halbur. 1997a. Effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) (isolate VR-2385) infection on bactericidal activity of porcine pulmonary intravascular macrophages (PIMs): In vitro comparisons with pulmonary alveolar macrophages (PAMs). *Vet. Immunol, Immunopathol* 59:323-335.

Thanawongnuwech, R., E. L. Thacker, and P. G. Halbur. 1998b. Influence of pig age on virus titer and bactericidal activity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infected porcine intravascular macrophages (PIMs). *Vet. Microbiol.* 63:177-187. PMID: 9850997

Terpstra, C. 1991. Epizootiología de la Fiebre Porcina Clásica. En las Memorias del 1er. Congreso Nacional sobre Fiebre Porcina Clásica. México, D. F. Trabajos Complementarios. P. 1-23.

Terpstra, C. 1992. Epizootiology, Control and Erradicación of hog cholera in high density pig production areas. En las memorias del: Symposium sobre enfermedades del cerdo. Congreso Internacional . Ciudad Universitaria. UNAM. México. p. 107-117.

Tizard, I. 1992. *Inmunología Veterinaria*. Department of Veterinary Pathology. The Texas Veterinary Medical Center. Texas A&M University.

Van Oirschot, J. T. 1992. Hog Cholera. En: *Diseases of Swine*. 7 Edición, Iowa State University Press. P. 274 –292.

Vargas S. A., 2003. Efecto de un inmunoestimulante en cerdos vacunados contra el síndrome respiratorio y reproductivo porcino e inoculados con un virus de referencia. Tesis de Maestro en Ciencias. UNAM. México, p 99.

Wayne. W. Daniel. 1991. *Bioestadística*. Base para el análisis de las ciencias de la salud. Ed. Limusa Noriega. Sexta impresión.

Wens voort, G., Bloemraad, M., Terspra, C. 1988. An enzyme immunoassay, employing monoclonal antibodies against classical swine fever virus. *Veterinary Microbiology*. 17:129 – 140.

Widjoatmodjo, M. N., Van Gennip, H. G. P., Smit, A. J. And Moormann, R. J. M. 1999. Comparative sequence analysis of classical swine fever virus isolates the epizootic in the Netherlands in 1997 – 1998. *Veterinary Microbiology* 66:291 – 299.

Zimmerman, J. and Kyong – Jim, Y. 2000. PRRS Epidemiology. *Memorias del Simposium Internacional Sobre Enfermedades emergentes del Cerdo*, Irapuato, Guanajuato, México. Academia Veterinaria Mexicana, A.C.

10. Anexos

Los presentes anexos indican las técnicas de laboratorio, relación de equipo, material, reactivos y/o cuadros sinópticos.

10.1 Descripción de las pruebas de diagnóstico

10.1.1 ELISA de captura.

La placa posee un anticuerpo monoclonal específico ligado a la superficie y una vez que se lava la placa de trabajo, se adiciona un segundo anticuerpo monoclonal y se agrega la muestra de virus del suero problema que fue previamente aplicado en una placa de cultivo celular, con poca capacidad de fijar partículas. Después de una segunda incubación se retira el inóculo, se lava la placa y se adiciona un cromógeno sustrato (Socci, 1998).

Procedimiento

1.- Se prepararán todos los reactivos del “Kit” de ELISA, posteriormente se equilibrarán los reactivos a la temperatura de incubación requerida; se determinará la cantidad de solución de lavado y dilución para lavado de microplacas; posteriormente la solución concentrada se diluye 10X (1:10) con agua destilada (1 parte de concentrado con 9 partes de agua); y debe tener un pH entre 5.5 y 6.0; se determina la cantidad de diluyente de muestra y conjugado, necesario para la dilución de las muestras controles y conjugado (diluir 1 parte del aditivo A, con 1 parte del aditivo B y con 3 partes de agua destilada).

Se prepararán las muestras de tejido, homogenizando las muestras de tejido en un mortero, se diluirán los tejidos homogenizados 1:5 ó 1:10 con PBS, esta dilución puede ser analizada de la misma forma que una muestra de suero y se hace la dilución, distribución e incubación de muestras y controles, las cuales se les aplica los siguiente pasos:

- a. Adicionar 50µl de diluyente de muestra y conjugado en cada pozo
- b. Adicionar 150µl de muestras y controles sin diluir en los pozos correspondientes
- c. Se mezclarán los contenidos mediante el movimiento suave de la placa

d. Se cubrirá la microplaca e incubará durante 6 minutos a 37°C en una cámara húmeda

Lavado de la microplaca. Posteriormente se lavará cada placa, desechando completamente el contenido de los pozos, llenando cada pozo con al menos 300µl de solución de lavado y dilución, evitando la formación de espuma (se repetirá dos veces), se sacudirá la placa para vaciar completamente los pozos, golpeando suavemente sobre papel absorbente.

El siguiente paso será hacer la dilución e incubación del conjugado con los siguientes pasos.

a. Se diluirá el conjugado 1:200 mediante el empleo del diluyente de muestras y conjugado.

b. Se adicionarán 200 µl de la solución en cada pozo y se incubará la microplaca durante 60 minutos a 37°C en una cámara húmeda, terminando esto se procederá a lavar la microplaca, en seguida se adicionará el cromógeno, adicionando 200µl de cromógeno (precalentado a 25°C) a cada pozo, y finalmente se hace la lectura de los resultados.

Los resultados se leen en un fotómetro a una longitud de onda de 405 nm. Tan pronto como la diferencia de la densidad optica (DO) entre el control negativo y el positivo sea > ó igual a 0.4 (normalmente esto ocurre entre 15 a 40 minutos después de la adición del cromógeno), la reacción podrá detenerse mediante la adición de 50µl de solución de frenado, la cuál debe añadirse en el mismo orden y a la misma velocidad en que se añadió el cromógeno.

Interpretación de resultados.

$$\text{Valor (\%)} = \frac{\text{DOMuestra} - \text{DOneg} \times 100}{\text{DOPos} - \text{DOneg}}$$

Valor < 30 % = negativo; 30-40 % = sospechoso; > 40% = positivo.

(ELISA, 1996; Flock-Chek, 1996; Socci, 1998).

ELISA de captura.
Equipo e Instrumentos.

1. Estufa bacteriológica a 37°C
2. Cámara húmeda
3. Lector de ELISA con impresora
4. Pipetas individuales
5. Pipetas multicanales
6. Potenciometro
7. Lector de ELISA con impresora

Materiales

1. Matraces
2. Probetas
3. Vasos de precipitados
4. Pipetas de vidrio
5. Reservorios para soluciones
6. Puntas para pipetas
7. Tapas para microplacas de 96 pozos
8. Toallas de papel

10.1.2 ELISA competitiva.

Esta prueba se utilizará para detectar anticuerpos contra el virus de la FPC y contra el virus del PRRS. Es una prueba rápida y confiable, donde se utilizan dos anticuerpos monoclonales que reconocen un epítipo específico diferente de la proteína E2 de la envoltura del virus.

La reacción se interpreta como sigue: si ambos anticuerpos monoclonales se unen al antígeno, la enzima peroxidasa induce una reacción cromógena, indicando que el suero problema es negativo a un anticuerpo contra el virus; y si uno o ambos epítopes son bloqueados por anticuerpos del suero problema y el conjugado, al ser lavado los pozos permanecen claros, esto indica que el suero problema contiene anticuerpos contra el virus de la FPC.

Interpretación:

Si hay reacción con color el resultado es negativo y sin color el resultado es positivo.

Procedimiento de la prueba:

Inicialmente se preparará el conjugado, antígeno y suero, a temperatura ambiente.

Enseguida se adicionarán 50 µl del suero de referencia 1) (muy positivo) para el pozo A1 y B1 de la placa de prueba; se adicionarán 50 µl del suero de referencia; 2) (medianamente positivo) para el pozo C1 y D1 de la placa de prueba; se aplicarán 50 µl del suero de referencia 3) (medianamente negativo) para el pozo E1 y F1 de la placa de prueba; se aplicarán 50 µl del suero de referencia; 4) (totalmente negativo) para el pozo G1 y H1 de la placa de prueba; se aplicarán 50 µl de los sueros problema en dilución, en cada uno de los pozos correspondientes de la placa de prueba; posteriormente se aplicarán 50 µl de el conjugado diluido 1:30, en los pozos de la placa de prueba, y en seguida aplicar 50 µl del antígeno diluido 1:30, en los pozos de la placa de prueba; se sella la placa con papel sello, y se agitan suavemente los pozos de la placa de prueba durante 10 segundos; después se incuba la placa con la solución de cromógeno sustrato, a temperatura ambiente, durante 90 minutos, se vaciarán los pozos de la placa y se lavarán con solución de lavado (600 ml de PBS + 300 µl de Tween 80) para una placa, en 3 tiempos o periodos de solución; después aplicar 100 µl de la solución de cromógeno sustrato a todos los pozos de la placa; y se incuba la placa a temperatura ambiente durante 15 – 20 minutos; después se detendrá la reacción mediante la adición en todos los pozos de 10 µl de ácido sulfúrico 0.5 M y finalmente se leerá inmediatamente la placa en un lector de ELISA a una densidad óptica de 450 nm.

Fórmula para calcular los resultados

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{100 - (\text{DO de la muestra}) \times 100}{(\text{DO} \times \text{X del suero de referencia 4})}$$

Interpretación de los resultados:

0 – 30 % de Inhibición = negativos a anticuerpos contra el virus de la FPC.

31 – 50 % de Inhibición = sospechosos, repetir la prueba

51 – 100 % de Inhibición = positivo a anticuerpos contra el virus de la FPC.

(Flock-Chek, 1996).

ELISA competitiva.

Equipo:

1. Estufa bacteriológica a 37 °C con humedad
2. Impresora
3. Lector para placas de ELISA con impresora
4. Micropipetas de 8 – 12 canales con capacidad de 50 – 300 µl
5. Micropipeta de un solo canal de 5 – 100 µl
6. Pipetas de 1, 5, y 10 ml
7. Potenciómetro
8. Refrigerador de 9 pies cúbicos con congelador

Materiales:

1. Frascos de vidrio de 50, 100 y 500 ml con tapón de rosca
2. Microplacas de plástico de 96 pozos con anticuerpo monoclonal ligado a la superficie, preservados en glicerina
3. Microplacas de plástico con 96 pozos de fondo plano
4. Puntas de plástico para micropipetas de 300 µl de capacidad
5. Recipiente contenedor de soluciones
6. Vaso de precipitado de 500 ml
7. Toallas de papel

Reactivos :

1. Sueros de referencia, 1) Suero positivo fuerte, 2) Suero positivo débil, 3) Suero negativo de referencia o débil y 4) Suero negativo
2. Acetato de Sodio 0.1 M
3. Acido acético
4. Àcido sulfúrico 0.5 M
5. Antígeno de FPC y de PRRS
6. Conjugado de peroxidasa – anticuerpo monoclonal
7. Dimetil sulfóxido (DOMOSO)
8. Peróxido de Hidrógeno al 30 %
9. Solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.2

10- Suero control negativo

11- Tetra metil benzidine (TMB)

12- Tween 80

Condiciones ambientales de laboratorio a temperatura óptima de 18 a 26 °C

10.1.3 Técnica de RT-PCR

Esta prueba se utilizará para el diagnóstico de los virus del PRRS y FPC, por su sensibilidad y rapidez, mediante el uso de un fragmento de ácido nucleico, amplificado mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (ADN Polimerasa) que se mantienen inactivas a temperatura menor a 50°C, esto permite realizar los pasos de RT y PCR en un solo paso.

Extracción de ARN a partir de muestra sospechosa.

Obtener 1 ml / tubo de reactivo y 100 mg de tejido homogeneizado con 1 ml de trizol, mezclar bien volcando los tubos varias veces, e incubar 5' a temperatura ambiente. En seguida centrifugar unos segundos a 12, 000 rpm para eliminar la porción de la muestra que quedó en la tapa, se añaden 0.2 ml / tubo de cloroformo y se agitan en un vortex de 10'' a 15'' a temperatura ambiente; centrifugar a 4 °C, a 10, 000 rpm durante 15', y recoger la fase superior, con cuidado de no arrastrar interfase y pasarla a otro tubo. Posteriormente añadir 0.5ml de isopropanol y mezclar bien por inversión 10' a temperatura ambiente. Después centrifugar a 4°C a 12, 000 rpm durante 10', y retirar el sobrenadante con cuidado de no arrastrar el "pellet".

Posteriormente lavar el "pellet" con 500 µl de etanol al 75 %, agitar ligeramente, y centrifugar a 4°C, a 12, 000 rpm durante 5' (poniendo los tubos en la misma orientación que en la centrifugación anterior).

Retirar el sobrenadante con cuidado de no arrastrar el "pellet", pero tratando de apurar el líquido, y secar a temperatura ambiente (10 minutos), hasta que no haya líquido; enseguida resuspender en 10 µl de H₂O pipeteando varias veces, y finalmente guardar a - 20 °C hasta su uso (Romero,1998).

10.1.4 Electroforesis

1. En un matraz de 100 ml se pesan 0.8 gramos de agarosa .
2. Añadir 40 ml de Tampón TAE .
3. Calentar el horno de microondas hasta que la agarosa este bien disuelta .
4. Añadir bromuro de etidio hasta una concentración final de 0.5 µg/ml. Agitar para que se reparta homogéneamente el colorante.
5. Preparar la bandeja con los peines. Verter la agarosa disuelta sobre la bandeja. Esperar a que gelifique (unos 20 minutos).
6. Poner la bandeja en la cubeta y añadir Tampón TAE, hasta que cubra el gel.
7. Preparar las muestras añadiéndoles 3 µl de Tampón de carga 10 x .Cargar 10 µl de cada muestra en los pocillos del gel. Poner el marcador de peso molecular en un pocillo.
8. Conectar a la fuente de alimentación y dejar correr el gel (Romero,1998).

REACTIVOS de la técnica de RT-PCR	VOLUMEN (Reacción 25 µl)
Buffer 10 x Taq Gold	2.5 µl
Cl ₂ Mg 25 micro moles	2 µl
NTPs 10 micro moles	0.5 µl
Inhibidor de RNasa 20 u / µl	0.25 µl
MUMLV 50 u / µl	0.25 µl
Taq Gold 5 u / µl	0.125 µl
Primers FPC – A 20 Unidades Molar	0.25 µl
Primers FPC - D 20 Unidades Molar	0.25 µl
H ₂ O	16.87 µl
Usar 23 µl de RT-PCR Mix	
Usar 2 µl del ARN Muestra problema	
Tampón	
TAE 50 X:	
a. Tris	121 g - 242 g
b. Acetico glacial	28.5 - 57.1
c. EDTA 0.5 M pH 8	50 ml - 100 ml
d. Agua	500 ml - 1 litro

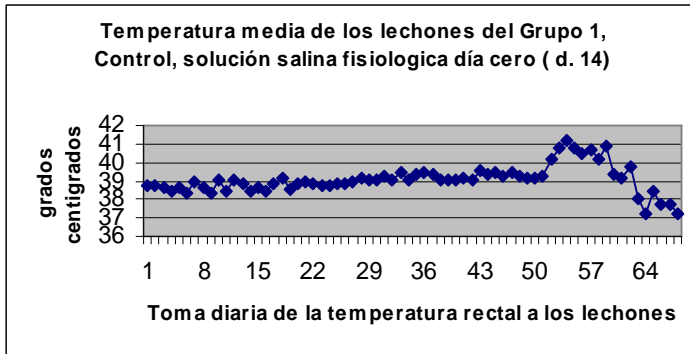
Tampón de carga 10 X:

- a. Glicerol 30 %
- b. Azul de Bromofenol 0.2 %
- c. Xilencianol 0.2 %

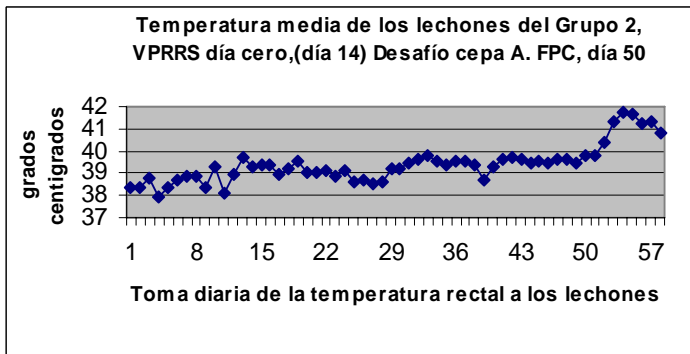
(Romero y Col.,1998).

10.1.5 Gráficas

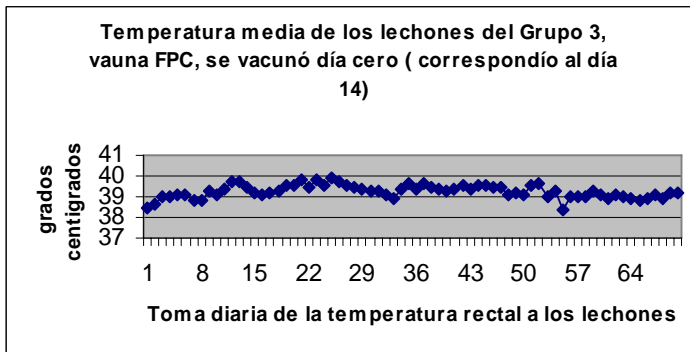
Gráfica 6



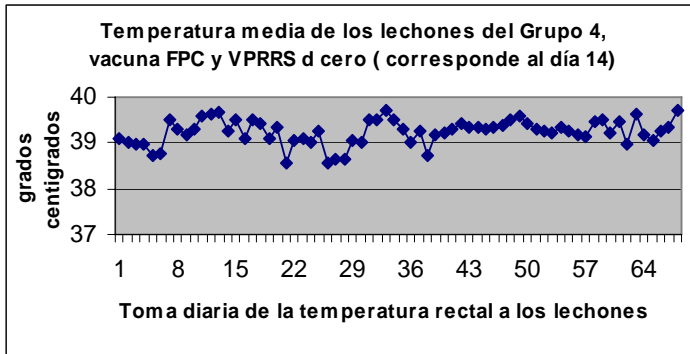
Gráfica 7



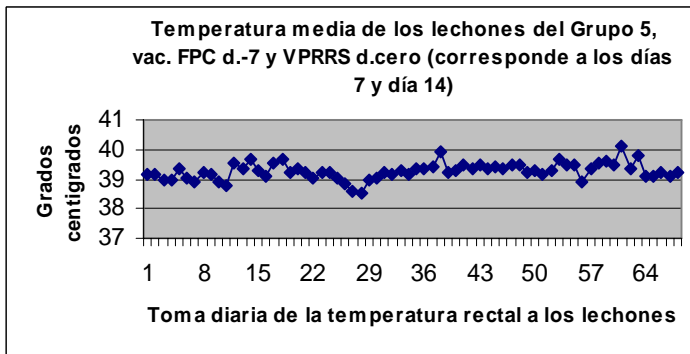
Gráfica 8



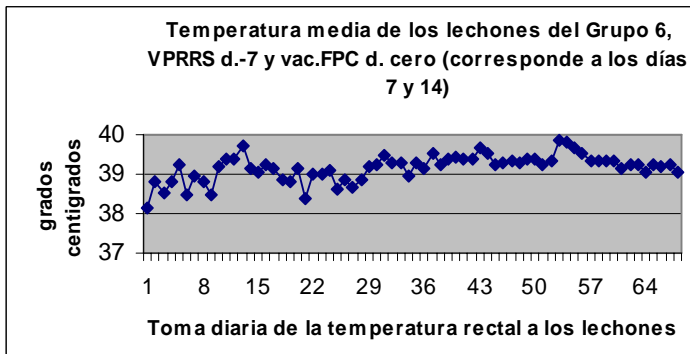
Gráfica 9



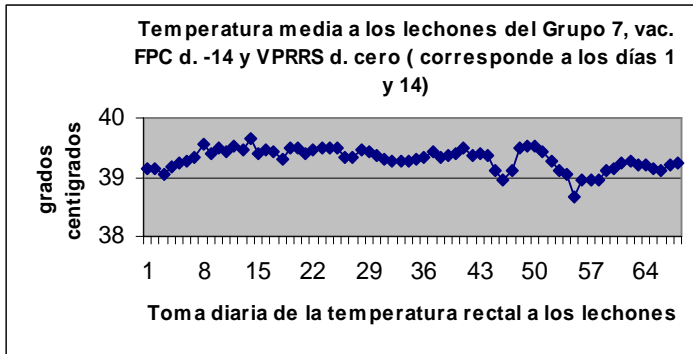
Gráfica 10



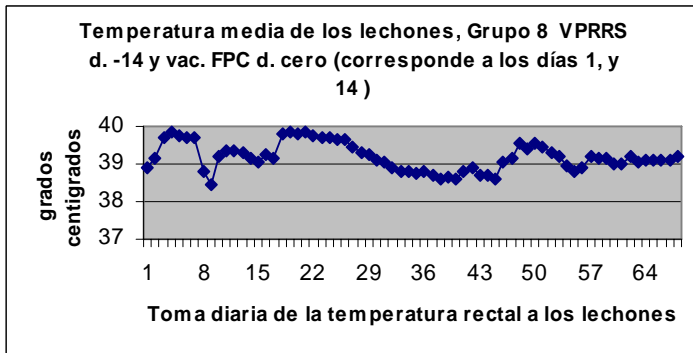
Gráfica 11



Gráfica 12



Gráfica 13



11.0 ABREVIATURAS.

ADCC: Citotoxicidad Celular Dependiente de Antígenos

ADN: Ácido Desoxiribonucleico

ARN: Ácido Ribonucleico

CD: Antígeno de diferenciación leucocitaria

Células NK: Células Asesinas Naturales

CMH: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

EDTA: Ácido Tetraacético de Etilendiamina

ELISA: Inmuno Ensayo Ligado a Enzimas

DINESA: Dispositivo Nacional de Emergencia de Salud Animal

DO: Densidad Óptica.

FPC: Fiebre Porcina Clásica

IFN: Interferón

IgS: Inmunoglobulinas

IgG: Inmunoglobulina G

IgA: Inmunoglobulina A

IgM: Inmunoglobulina M

Linfocitos CD4: Células (Cluster) de diferenciación 4

Linfocitos CD8: Células (Cluster) de diferenciación 8

MEM: Medio Mínimo Esencial

NOM- 037-ZOO: Norma Oficial Mexicana – 037-Zoosanitaria

PBS: Solución Buffer de Fosfatos

PRRS: Síndrome Respiratorio Reproductivo Porcino

RT- PCR: Transcriptasa Reversa – Reacción en Cadena de la Polimerasa

SAGAR: Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural

SLA: Antígeno de Histocompatibilidad Porcina

SSF: Solución Salina Fisiológica

TCID: Dosis Infecciosa de Cultivo de Tejido

TNF: Factor de Necrosis Tumoral

VFPC: Virus de Fiebre Porcina Clásica