



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**Detección Precoz por Inmunofluorescencia de Virus de
Cólera Porcino en Leucocitos de Cerdos Infectados**

T E S I S
que para obtener el título de
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A
MOISES FRAIRE CACHON
A S E S O R E S
MVZ. AURORA VELAZQUEZ E.
MVZ. JUAN GARZA RAMOS
MVZ. FERNANDO OLGUIN R.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

C O N T E N I D O

	Pág.
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
MATERIAL Y METODOS	7
RESULTADOS	11
DISCUSION	18
CONCLUSIONES	22
BIBLIOGRAFIA	23

RESUMEN.-

Se empleó la técnica de Anticuerpos fluorescentes, para detectar el virus del Cólera Porcino en leucocitos de muestras de sangre provenientes de: cerdos sospechosos de padecer la enfermedad por infección natural, de 10 animales inoculados en forma experimental utilizando la cepa virulenta AMES, - de 10 cerdos inoculados con la cepa modificada PAV 250 y de 10 cerdos sin inocular.

En el grupo de los animales sospechosos 26 muestras presentaron fluorescencia específica y 33 resultaron negativos -- igual que las muestras de los cerdos controles.

En los 10 cerdos inoculados con la cepa AMES, se observó - fluorescencia específica en los leucocitos desde el cuarto y quinto día posterior a la inoculación.

En los 10 cerdos inoculados con la cepa PAV 250 no se observó el antígeno viral en los leucocitos.

El diagnóstico emitido se comprobó realizando la prueba de inmunofluorescencia sobre impresiones de tonsilas, ganglios y bazo, obtenidos cuando se sacrificaron o murieron animales de los diferentes grupos.

INTRODUCCION.-

El Cólera Porcino (C.P.), es una enfermedad de los cerdos, producida por un virus de la familia Togaviridae, que los afecta en forma hiperaguda, aguda ó crónica, con resultados generalmente mortales. En la forma hiperaguda no se observan signos clínicos y la muerte acontece súbitamente. En los casos crónicos, los animales sobreviven más de 30-días, resolviéndose con la muerte ó la recuperación de los animales afectados (13). En nuestro país esta enfermedad - se presenta con mayor frecuencia en la forma aguda, y los signos más comunmente observados en los animales afectados son: apatía, pereza, anorexia, hipertermia, conjuntivitis, constipación, diarrea, eritema marcado de la piel; hacia - la fase final de la enfermedad, los animales se agrupan -- unos sobre otros, al cuarto día de iniciado los signos su - fren incoordinación y paresia de los miembros posteriores. La muerte generalmente sobreviene entre los 7 y 12 días -- después de manifestarse los primeros signos (13,15).

El virus que produce la enfermedad no tiene cepas antigénicamente diferentes pero sí estirpes que varían en su virulencia lo que produce las diferentes formas de presentación de la enfermedad (4,13,15,24).

En condiciones naturales la infección viral se efectúa a - través de las mucosas del tracto digestivo superior o del aparato respiratorio, a partir de aerosoles, agua ó alimentos contaminados con heces, orina y otros exudados corporales provenientes de animales enfermos (13, 22, 29, 31)

Experimentalmente se ha estudiado la patogenia del virus,-

haciendo inoculaciones en animales susceptibles por diferentes vías y determinando el orden cronológico en que se afectan los órganos, detectando la presencia del antígeno viral mediante el examen histopatológico, por inmunofluorescencia ó inoculando animales susceptibles (10,11,12,14, 29).

Las muestras para determinar la localización del virus se tomaron a diferentes lapsos y el virus se localizó inicialmente en las tonsilas entre la primera y tercera hora después de la inoculación (2,13,14,27,29). A la quinta hora, el virus se detectó en los ganglios linfáticos regionales, en los que produjo una ligera inflamación e infiltración eosinofílica. A la octava hora, el virus se detectó en la sangre, principalmente en los leucocitos los cuales fueron altamente infectantes para animales susceptibles (13,29).

Entre quince y dieciocho horas, el virus se encontró, en el sistema linfático y en la pared de los vasos sanguíneos, produciendo degeneración hidrópica del endotelio vascular de los capilares, y después de cuarenta y ocho horas, se pudo encontrar en los tejidos de la mayoría de los órganos. El virus alcanzó su máxima concentración en la sangre entre el quinto y octavo día, después de la inoculación en los -- casos crónicos la concentración viral tiende a disminuir a partir del décimo día (10,11,12,13,14).

El tiempo en que se efectúan estos cambios y la severidad de las lesiones que se producen, varían de acuerdo a la -- virulencia de las cepas del virus colérico, a la resistencia y respuesta inmune individual, a las asociaciones -- bacterianas que agravan el cuadro, produciendo diferentes -- formas de presentación de los signos, así como cambios patológicos post-mortem, de tal forma que en cada caso --

nes el Médico Veterinario no puede efectuar un diagnóstico oportuno (3,5,8,10,24,35)

Muchos investigadores se han dedicado a buscar un método rápido y eficaz para el diagnóstico del C.P., basándose -- tanto en la historia y cuadro clínico como en las lesiones observadas a la necropsia de los animales sospechosos, tam-- bien se han ensayado reacciones serológicas, determinación de la modificación de los niveles de calcio y fósforo en -- el suero sanguíneo, cuenta leucocitaria y más recientemente empleando las técnicas de inmunofluorescencia en mues-- tras obtenidas a partir de exámenes post-mortem.

Los métodos empleados para confirmar el diagnóstico de C.P. han mostrado ser eficientes pero en cada uno, existen lími-- tantes.

- a) La historia y signología clínica en muchos casos no son de valor diagnóstico en virtud de que existen otras enfermedades que presentan los mismos signos y lesiones(7,13,24,35)
- b) La cuenta leucocitaria es una de las pruebas más empleadas en el diagnóstico, debido a que el virus produce un descenso en el número de leucocitos de los cerdos enfermos. En casos crónicos la cuenta leucocitaria permanece normal y en animales sanos menores de 5 meses, es común encontrar cuentas inferiores a la normal, que pueden -- confundirse con una leucopenia de origen viral (13,21, 37).
- c) La cuenta de plaquetas tambien se emplea como diagnósti-- co auxiliar, su descenso puede indicar la presencia de la enfermedad, sin embargo la trombocitopenia se presen-- ta en otras enfermedades septicémicas que producen hemo-- rráxias (34)

- d) La prueba de la amilasa que se efectúa a partir de extractos de páncreas de los animales sospechosos, tiene el inconveniente de que dietas ricas en grasa y enteritis inespecíficas producen resultados falsos (25,35).
- e) El diagnóstico histopatológico se efectúa en muestras de órganos obtenidos post-mortem, pero solo es efectivo en oos casos agudos ó crónico cuando las lesiones alcanzan a desarrollarse, con el inconveniente de que se enmascaran cuando existen infecciones secundarias - (13,32).
- f) La prueba de fijación del complemento es útil para detectar niveles de anticuerpos en la piera ó para determinar el antígeno viral en los extractos de órganos de animales muertos, sospechosos de C.P. Esta prueba es - difícil de efectuar por la presencia de complemento -- termoestable en el suero porcino y por la fácil inactivación de los reactivos utilizados en la prueba (8).
- g) La inhibición de la hemoaglutinación utilizando eritrocitos sensibilizados con anticuerpos contra el C.P., es fácil de efectuar pero presenta gran número de reacciones inespecíficas (30).
- h) La prueba de precipitación en agar es utilizada por muchos investigadores, tanto para detectar anticuerpos, - como antígenos virales, su inconveniente radica en que los sueros hiperinmunes contienen anticuerpos inespecíficos contra los tejidos en que se encuentra incluido el virus con que se producen los sueros inanes (17).
- i) las pruebas de exaltación de virus indicadores, como -

el virus de la enfermedad de Newcastle, el de la enfermedad de Teschen y otros virus que se replican en cultivos celulares con efecto citopatogénico, aumentan este efecto cuando se cultivan junto con virus de C.P.- Esta prueba requiere de condiciones de laboratorio muy especializadas que limitan su utilización (19,20)

j) La reproducción de la enfermedad en animales susceptibles es una prueba eficaz pero su costo y el tiempo -- que requiere la han limitado, además en zonas en donde se quiere erradicar el C.P., está prohibido efectuar - esta prueba (13,23)

k) Desde 1963 se ha empleado con creciente éxito la prueba de anticuerpos fluorescentes en el diagnóstico de - C.P. utilizando cortes por congelación, impresiones o frotis de amígdalas, ganglios linfáticos, bazo y otros órganos, así como cultivos celulares inoculados con material sospechoso. Esta prueba es la que ha mostrado tener mayor grado de eficacia. Sin embargo los animales vacunados con virus "vivo" modificado dan también resultados positivos y es sumamente difícil distinguir los de los naturalmente infectados (2,3,5,6,9,10,16,23 27,28,33,35)

El objetivo de este trabajo fue el de emplear la prueba - de los anticuerpos fluorescentes, que es sencilla y de alta confiabilidad, para evidenciar la presencia de antígeno viral en los leucocitos de animales enfermos de C.P. - En virtud de que se ha demostrado que estos leucocitos -- son infectantes desde pocas horas de iniciada la infección, hasta la resolución de la misma.

MATERIAL Y METODOS

Material:

30 cerdos sanos de 3 meses de edad, sin antecedentes de vacunación contra el C6lera Porcino.

59 cerdos sospechosos de C6lera Porcino

Conjugado contra el C6lera Porcino*

Virus virulento de C6lera Porcino cepa Ames*

Vacuna contra el C6lera Porcino elaborada con cepa PAV 250**

Microscopio Carl Zeiss equipado con una lámpara de mercurio HBO 200, condensador de campo oscuro t6rico cardioide, filtros excitadores BG 12 1mm, UG 2, filtros de barrera 44 y 47 objetivos de 6.3X, 16X, 40X, 100X, oculares 10X y aditamento para fotografía. Película de color 64ASA 35mm.

Métodos:

A los 30 cerdos se les identific6 individualmente y se dividieron en tres lotes, alojando cada lote en zahurdas independientes y aisladas una de la otra.

Durante 8 días consecutivos se efectu6 un exámen minucioso a cada cerdo y se les tomaron muestras de sangre, ninguno de los animales present6 anomalía que interfiriera con la prueba.

Después del período de observación, se inocul6 a uno de los lotes con virus virulento de C6lera: a otro lote se le aplic6 una vacuna de virus modificado en cultivo de tejido contra el C6lera Porcino, los cerdos del lote restante se emplearon como testigos, el exámen clínico y la toma de muestras de sangre se hizo diariamente durante 21 días, al final de los cuales se di6 por terminado el trabajo.

Se obtuvieron muestras de 59 cerdos sospechosos, en las Granjas porcícolas situadas en zonas en donde se presenta el C.F. en forma enzootica, otros casos fueron enviados por el Departamento de Producción Animal: Cerdos, y por medicos Veterinarios.

* Proporcionado por el Departamento de Virología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, -- UNAM.

** Proporcionada por la Productora Nacional de Biológicos -- Veterinarios de la SARH.

rios particulares, al Departamento de Virología e Inmunología de esta Facultad.

Los cerdos se sangraron por punción en el golfo de las yugulares y la sangre se colectó en tubos heparinizados. En el laboratorio, la sangre se colocó en tubos de 10x75 mm y se procesó como sigue:

1. Centrifugación a 2,500 rpm. durante 5 minutos
2. Extracción de la capa de leucocitos, cada muestra se distribuyó en dos tubos, indetificados con suero normal (S.N.), suero hiperinmune (S.H.).
3. Al tubo conteniendo células blancas marcado con S.N. se le agregaron 2 ml de una dilución de 1:5 de suero normal de cerdo. Al tubo marcado con S.H. se agregaron 2ml de una dilución de 1:5 de suero de cerdo inmune a Cólera Porcino.
4. Las suspensiones celulares se incubaron durante 20 minutos a 37.0°C. y se centrifugaron a 2,500 rpm. durante 5 minutos, decantándose el sobrenadante.
5. El sedimento se lavó resuspendiendo las células en solución salina amortiguadora 0.1 M., pH 7.4.
6. Nueva centrifugación u decantación del sobrenadante.
7. Se resuspendió el sobrenadante en una dilución del conjugado previamente titulado.
8. Incubación durante 20 minutos a 37.0°C.
9. Se centrifugó y decantó el conjugado.
10. Se resuspendió en agua buffer de fosfatos pH 7.4 para eliminar el exceso de conjugado.
11. Se sedimentó por centrifugación decantando el sobrenadante.
12. Se hicieron frotis con cada uno de los sedimentos sobre una laminilla, identificando cuales células fueron tratadas con suero normal y cuales con suero hiperinmune.

Las muestras se consideraron positivas cuando se encontró fluorescencia color verde manzana, característica del isotiocianato de fluoresceína, en el citoplasma de las células tratadas con suero normal y que fué inhibida en las células tratadas con suero hiperinmune.

Debido a la dificultad que se presentó para obtener las muestras, cuando fué necesario sangrar a muchos animales en un mismo día, así como para evitar el manejo excesivo de las muestras durante su proceso, se efectuó la siguiente variante de la técnica.

1. Las muestras se tomaron por punción de una de las venas de la oreja de los animales, colectando la sangre en tubos capilares heparinizados de 1mm de diámetro por 75mm de largo que se identificaron, pegando un trozo de tela adhesiva con los datos en el extremo superior del tubo y se insertaron sobre una barra de plastilina para facilitar su manejo.
2. En el laboratorio, los capilares se sellaron a la flama por uno de sus extremos y se centrifugaron a 2,500-rpm. durante 5 minutos, para separar los glóbulos blancos de los eritrocitos.
3. Se cortó el tubo capilar con un lápiz de punta de diamante ligeramente abajo de la capa de células blancas, depositándolas sobre una laminilla junto con una o dos gotas de plasma en el que se resuspendieron las células y con ellas se hicieron frotis de un espesor medio.

4. Los frotis se secaron al aire, se identificaron y se trazaron sobre ellos dos círculos, marcando a uno con S.N. y el otro S.H., fijándolos durante 5 minutos con alcohol metílico absoluto a -18°C .
5. Después de la fijación en alcohol, los frotis se fijaron en acetona a -18°C durante 10 minutos
6. Los frotis se retiraron de la acetona, se dejaron secar y se cubrió la superficie del círculo marcado S.N. con una dilución de 1:5 de suero normal y la superficie del círculo marcado con S.H. con suero hiperinmune contra -- C.P. diluido también 1:5. Las muestras se incubaron 15 minutos en cámara húmeda a 37.0°C .
7. Se lavaron las muestras con solución salina buffer de-- fosfatos pH 7.4 cubriendo ambas superficies con conjugado anti C.P., previamente titulado, incubándolas durante 30 minutos a 37.0°C en cámara húmeda.
8. Se lavaron las muestras durante 5 minutos utilizando solución salina buffer en tres ocasiones y se enjuagaron dos veces en agua buffer.
9. Los frotis se montaron en glicerina buffer pH9.0 protegiéndolas con un cubreobjeto y se observaron al microscopio.

RESULTADOS.

Los resultados de las observaciones en las muestras de los diferentes lotes de animales en que se efectuó el trabajo, se anotan en los siguientes cuadros:

CUADRO No. 1

CERDOS SANOS SUSCEPTIBLES, INOCULADOS CON EL VIRUS VIRULENTO DE COLERA PORCINO.

Animales		DIAS POST-INOCULACION									
Num.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1		-	-	-	-	+	+	+	S*		
2		-	-	-	+	+	+	+	M*		
3		-	-	-	-	+	+	+	S*		
4		-	-	-	-	+	+	+	S*		
5		-	-	-	+	+	S*				
6		-	-	-	-	+	+	+	S*		
7		-	-	-	+	+	+	+	M*		
8		-	-	-	-	+	+	+	+	M*	
9		-	-	-	-	+	+	+	+	S*	
10		-	-	-	-	+	+	+	+	S*	

- + Animales positivos a inmunofluorescencia en los leucocitos
- Animales negativos a la prueba de inmunofluorescencia en los leucocitos.
- * Positivos en tonsilas, ganglios linfáticos y bazo por la prueba de inmunofluorescencia.

S= Sacrificados

M= Muertos

En este cuadro se anotaron los resultados de las observaciones en las muestras de los cerdos sanos susceptibles, inoculados con el virus virulento y que enfermaron mostrando los signos típicos. Se detectó la presencia del virus, en los linfocitos circulantes entre el cuarto día postinoculación hasta el noveno día en que los animales murieron o fueron sacrificados, encontrando también el antígeno viral en tonsilas, ganglios linfáticos y bazo mediante la prueba de inmunofluorescencia.

CUADRO No. 2

**CERDOS VACUNADOS CON VIRUS MODIFICADO EN CULTIVO DE TEJIDO
CEPA PAV 250.**

Animales No.	DÍAS POST-INOCULACION																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	21	
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
7	-	-	-	-	-	-	S*										
8	-	-	-	-	-	-	-	S*									
9	-	-	-	-	-	-	-	-	S*								
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S*							

- Negativos en leucocitos por inmunofluorescencia

* Positivo en tonsilas, ganglios linfáticos y bazo por inmunofluorescencia

S = Sacrificados.

Se observa que los 10 cerdos susceptibles vacunados con virus "vivo" modificado en cultivo de tejido, no mostraron signos clínicos ni se observó el virus en los leucocitos durante los 21 días que duró la observación, sin embargo se pudo detectar el virus en muestras de tonsilas y ganglios linfáticos cuando se sacrificaron los cerdos 7,8,9 y 10 entre el séptimo y décimo día.

CUADRO No. 3**CERDOS CONTROLES SIN INOCULAR**

	Días																
Animales Num.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	21	
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
8	-	-	-	-	-	-	-	g°									
9	-	-	-	-	-	-	-	-	g°								
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	g°							

- Negativos en leucocitos mediante la prueba de inmunofluorescencia

* Negativos en tonsilas ganglio y bazo en inmunofluorescencia

S = Sacrificados.

Se muestra en 10 animales sanos sin inocular no se encontró fluorescencia en las muestras de leucocitos tomados durante el período de observación ni en los órganos obtenidos de animales que se sacrificaron los días octavo, noveno y décimo.

CUADRO No. 4**ANIMALES O MUESTRAS PRESENTADOS EN EL LABORATORIO PARA
DIAGNOSTICO**

Animales No.	Días					Animales No.	Días					Animales No.	Días				
	1	3	5	7	21		1	3	5	7			1	3	5	7	
1	-	-	-	-		21	-	-	-	-		41	-	-	-	-	
2	-	-	-	-		22	-	-	-	-		42	+	+	+	S	
3	-	-	-	-		23	-	-	-	-		43	+	+	M		
4	-	-	-	-		24	+	+	+	M		44	+	+	M		
5	-	-	-	-		25	-	-	-	-		45	+	+	+	S	
6	-	-	-	-		26	-	-	-	-		46	+	M			
7	-	-	-	-		27	-	-	-	-		47	+	+	+	S	
8*	+	+	+	+	+	28	-	-	-	-		48	+	+	M		
9	-	-	-	-		29	-	-	-	-		49	+	M			
10	-	-	-	-		30	-	-	-	-		50	+	+	M		
11	-	-	-	-		31	-	-	-	-		51	+	+	M		
12	-	-	-	-		32	+	+	+	M		52	+	+	+	S	
13	-	-	-	-		33	-	-	-	-		53	+	+	+	+	
14	-	-	-	-		34	+	+	+	M		54	+	M			
15	-	-	-	-		35	+	+	M			55	+	+	M		
16	-	-	-	-		36	-	-	-	-		56	+	+	M		
17	-	-	-	-		37	-	-	-	-		57	+	+	M		
18	-	-	-	-		38	+	+	M			58	+	M			
19	-	-	-	-		39	+	M				59	+	M			
20	-	-	-	-		40	+	+	M								

- Negativo en la prueba de Inmunofluorescencia en leucocitos circulantes.

+ Positivos en la prueba de Inmunofluorescencia en leucocitos circulantes y en la prueba de Inmunofluorescencia en órganos después de muertos.

* Positivos a Inmunofluorescencia en leucocitos circulantes, no mostraron nunca signos de enfermedad

S = Sacrificados

M = Muertos

Muestras de cerdos presentados en el laboratorio para diagnóstico.

En el cuadro se resumen los resultados de la prueba de inmunofluorescencia en muestras de 59 animales sospechosos de padecer Cólera Porcino. Se encontró fluorescencia en los -- leucocitos de 26 animales, también en tonsilas, ganglios -- linfáticos y bazo, cuando los animales murieron o fueron sacrificados después de una semana de observación.

El antígeno se encontró uniformemente distribuido en el citoplasma de los leucocitos infectados y en las plaquetas. La fluorescencia específica es color verde manzana característico, que debe diferenciarse de la fluorescencia específica no deseada producida por contaminación con diversos antígenos durante la producción de las inmunoglobulinas -- para preparar el conjugado y de la fluorescencia primaria azul blanca de los granulocitos.

El cerdo No. 8 mostró fluorescencia específica en los leucocitos circulantes durante todo el tiempo de observación, que en este caso en particular fué de 21 días, sin embargo el animal no mostró signos de la enfermedad. Se tomaron -- muestras de sangre, se conservaron en congelación y posteriormente se inocularon a dos cerdos susceptibles de 12 semanas de edad en los que se reprodujo la enfermedad.

Los animales numerados del No. 42 hasta el No. 57 provinieron de una granja en la que se produjo un brote comprobado de Erisipela. Estos animales se recuperaron cuando fueron sometidos a tratamiento, pero enfermaron nuevamente, -- se pensó en una recaída, sin embargo se enviaron muestras de sangre en las que se comprobó la presencia del antígeno viral de C.P. en los leucocitos y en los órganos de los -- animales muertos.

Los animales que resultaron negativos a la prueba de inmunofluorescencia y que respondieron a los tratamientos administrados, no se observaron durante más tiempo, ya que por necesidad de la granja fueron enviados al rastro.

DISCUSION.-

Los resultados de este trabajo revelan que mediante la prueba de anticuerpos fluorescentes, pudo detectarse el antígeno viral en los leucocitos circulantes de 10 cerdos inoculados por vía intraperitoneal con una cepa virulenta de Cólera Porcino. En tres animales se encontró el virus al cuarto día y en los siete restantes, al quinto día posterior a la inoculación. Esto coincide con el rango señalado por Cole (11), quien cultivó el virus en líneas celulares inoculando sangre de animales infectados experimentalmente, y reprodujo la enfermedad en cerdos susceptibles con los leucocitos de los mismos animales.

El virus no pudo ser detectado en los leucocitos de animales vacunados por vía intramuscular, con una cepa de virus de Cólera modificada en cultivo de tejido, en las que se sabe que éste ha perdido invasividad y como todos los antígenos es fagocitado y llevado por vía linfática a los ganglios regionales más próximos, o bien por vía sanguínea al bazo y ganglios linfáticos, en donde permanece estimulando al aparato inmuno competente (29). El virus vacunal puede ser demostrado mediante pruebas de aislamiento del virus en cultivos celulares y por inmunofluorescencia en los mismos órganos, al tercer día posterior a la inoculación. El hecho de no encontrar el virus en los leucocitos circulantes, durante el tiempo de la investigación, nos indica que no existe viremia en las vacunaciones con virus modificado en cultivo de tejido, lo que corrobora los estudios de Zinger y Mott (38), que no logran reaislar el virus vacunal en cultivo de tejido. Sin embargo, inoculando leucocitos de animales vacunados con las cepas que no han sido suficientemente modificadas, el virus se multiplica en los leucocitos

y ha podido aislarse (14).

Es interesante hacer notar que la leucopenia señalada por Aca
ves (1), en animales vacunados pueden deberse a la m
ultiplicacion del virus en los centros g
erminales del bazo y ganglios
linfáticos, disminuyendo con esto la producción de linfocitos
y no como originalmente se atribuyó a la multiplicación del -
virus en los leucocitos circulantes.

En casos crónicos de Cólera se ha aislado virus de la sangre
de cerdos enfermos, treinta días después de presentada la i
nfeccion y en animales recuperados de un brote de campo el v
irus se pudo aislar noventa días después de presentada la en-
fermedad (13).

En crías de cerdas vacunadas durante la gestación ó lechones
recien nacidos vacunados con virus "vivo" modificado, se han
presentado casos de insunotolerancia y 6 semanas después de
haber recibido el virus vacunal, los lechones muestran sig-
nos de Cólera y eliminar gran cantidad de virus, esto se -
debe a que el sistema inmunocompetente de los animales jóve-
nes aun no reconoce como extraño el virus vacunal, el cual -
puede contener una población de viriones que conserva cierto
grado de patogenicidad para el cerdo. Los viriones se multi-
plican en los cerdos tolerantes y adquieren una gran patoge-
nicidad (13).

En los casos anteriores: los cerdos tolerantes, los casos --
crónicos y los recuperados de brotes de campo, se crean un -
estado de portador, convirtiéndose estos animales en un peli-
gro para la población susceptible que no ha sido inmunizada
debidamente, pues como ya se dijo el virus que se recupera -
de ellos es de gran patogenicidad.

Dentro del grupo de cerdos presentados al laboratorio para-diagnóstico de Cólera, se pudo detectar fluorescencia especí-fica durante 21 días en los leucocitos del cerdo número ocho, sin que presentara signos clínicos. La sangre de este animal contenía virus virulento ya que la enfermedad se reprodujo - en dos cerdos susceptibles de 12 semanas cuando se les incu-ló esta sangre, los animales mostraron signos típicos a los 4 días posteriores a la inoculación muriendo 4 a 5 días des-pués. El virus fué detectado por inmunofluorescencia en leu-cocitos, tonsilas, ganglios linfáticos y bazo.

El diagnóstico precoz y preciso de Cólera Porcino es muy im-portante para el control de la enfermedad, sobre todo cuando existe una campaña que tiene la finalidad de detectar los -- brotes y aislar a los animales afectados para evitar la dis-e-minación de la misma.

La técnica descrita en este trabajo permite el diagnóstico - en un tiempo mínimo de 4 a 5 días después de que los anima-- les se han infectado. Además ofrece la ventaja de efectuarse dos horas después de recibidas las muestras en el laborato-rio. Ofrece también la posibilidad de distinguir entre una - leucopenia producida por el virus de Cólera Porcino y las -- producidas por otros agentes etiológicos, así mismo, abre la posibilidad de asegurar que la fluorescencia observada no se debe a virus vacunal, lo que frecuentemente sucede cuando se hace el diagnóstico por inmunofluorescencia en tonsilas, gan-glios y bazo (3,9,13).

La técnica para determinar el virus de los leucocitos circou-lantes permite sin lugar a duda identificar a los animales - portadores, lo que no se puede hacer por apreciación clínica. La detección de estos animales es importante para eliminar - los de la piara y evitar la diseminación de la enfermedad.

Considerando la extraordinaria similitud observada entre los aspectos clínicos y anatomopatológicos de la Peste - Porcina Africana y el Cólera Porcino, se hace necesaria la aplicación de técnicas de diagnóstico diferencial, que pueden incluir la técnica detallada en este trabajo utilizando un conjugado específico.

CONCLUSIONES.-

La técnica de diagnóstico de Cólera Porcino mediante la detección del virus utilizando la prueba de anticuerpos fluorescentes en leucocitos circulantes, es confiable y fácilmente aplicable en cualquier laboratorio en el que se emplee la inmunofluorescencia como método de diagnóstico.

El virus vacunal no se observa en los leucocitos, por lo -- que no interfiere con el diagnóstico.

BIBLIOGRAFIA.-

1. Aceves Gutiérrez Fernando. Tesis profesional UNAM. 1971
"Determinación de leucopenias producidas por
vacunas de virus vivo modificado en cultivos
de embrión de cerdo y lapinizados.
2. Aiken J.M., Hoopes J.H., Stair E.L. 1964. "Rapid Diagno
sis of Hog Cholera: A direct fluorescent --
antibody technique". JAVMA., SCI. PROC. 101-
St. Ann. Mtg. 282-284
3. Aiken J.M., Hoopes K.H., Rhodes M.B. 1967. "Won specifi-
ty of fluorescent antibody test for distin-
guishing Hog Cholera virus strains.
JAVMA. 150 (1): 59-51
4. Andrews C., Pereira N.G., Wild P. 1978. Viruses of ver-
tebrates 100-102
5. Bedell David., Mc Daniel H.A. 1968. "Recommended minimum
standar for detection Hog Cholera viral anti-
gen by the fluorescent antibody tissue sec-
tion technique Proc. 72Na U.S.L.S.A., Ann. -
Mtg. 440-443.
6. Belic Lasar S. 1973. "Comparative use of an interferen-
ce phenomenon and in an investigation of --
swine fever virus.
Doctoral Thesis. Facult of Veterinary Medici-
ne University of Belgrado Yugoslavy.
7. Blood D.C., Henderson J.A. 1976. Medicina Veterinaria -
479-483.
8. Bulanger P. y col. 1965. "Hog Cholera III Investigation-
of complement fixation test for the detec-
tion of the virus in swine tissue.
Can. Jour. Comp. Med. Vet. SCI. 29 (*): 201
208.
9. Carbrey E.A., Stewart W.C., Mc Daniel H.A. 1970. "Compa-
rison of Tissue section and cell culture im-
munofluorescent techniques for the detection
of Hog Cholera infection in experimentally -
infect pigs.
Proc. 74th Ann. Mtg. U.S.L.S.A: 512-514.

10. Cheville N.E., Mengeling W.L. 1969. "The pathogenesis of chronic Hog Cholera. Histology. Immunofluorescent and electron microscopic studies. J. Exper. Path. 20 (3): 261-274
11. Cole.C.G. Henley R.R. HUBBARD E.D., 1946. "Concentration of Cholera virus in the blood of the artificially infected swine. JAVMA. Assoc. 108-143.
12. Dunne H.W. y col. 1957. "The in vitro growth of Cholera virus in cell of peripheral blood" Amer. Jour. Vet. Res. 18 (68): 402- 407
13. Dunne H.W., Leman A.D. 1975. Diseases of swine 14th Ed. Iowa State University Press. 189-237.
14. Dunne H.W., Luedke. 1957. The growth of animal leukocytes and their use in the cultivation of animal virus.
15. Hagan William A., Bruner D.W., Guillespie J.H. 1970. -- Enfermedades infecciosas de los animales domésticos. Edit. Prensa Médica Mexicana: 889-901.
16. Henry E.J., Mc Daniel H.A. 1965. "Examination of specimens from suspected Hog Cholera cases by the immunofluorescent antibody tissue section -- and cell culture technique.
17. Janowsky H. y col. 1959. "Serological studies on swine fever in the gel diffusion precipitating test. Bull Vet. Inst. Pulawy 3(2): 6-13.
18. Kubin G. 1962. " La culture du virus de la Peste Porcine en couche monocellulaire. Bull off Intern Epizoot 57: 1395.
19. Kumagai T. y col. 1958. Detection of Hog Cholera virus by its effect on Newcastle disease virus in -- swine tissue culture. Sci. 128 (3320): 366.
20. Kumagai T. y col. 1961. A. new in vitro method (EDN) - for detection and measurement of Hog Cholera virus and its antibody by means of effect of HC virus on Newcastle disease virus in -- swine tissue culture. I. Establishment of -- standar procedure. J. Immunol. 87: 245

21. Lewis P.A.: Shope R.E. 1929. The study of the cells of the blood as an aid to the diagnosis of Hog Cholera JAVMA. 27 (2): 145-152.
22. Lin T. C., Shimizu Y., Kumagai T. 1969. Pathogenesis of hog cholera virus infection in experimentally inoculate swine. Nat. Inst. Anima. Hlts. Quart. 9:20
23. Mengeling W.L. 1964. "Field evaluation of the fluorescent antibody tissue culture test for diagnosis of hog cholera. Proc. AM. Vet. Med. - Assoc. 101:274
24. Neudorf R., Seidel H. 1971. "Enfermedades del Cerdo" Edit. Acribia Zaragoza Esp.: 603-616.
25. O'Neill, R.A.F. 1969. An evaluation of taylor's haemolytic and amylase test for the diagnosis of swine fever. Vet. Rec. 84: 492-495.
26. Pilchard E.I. and Segre D. 1962 New H.I. test for hog-cholera Proc. 66th. Ann. Mtg. U.S. Livestock Sanit Assoc. p. 476.
27. Peckham J.C., Cole J. R. Jr., Pursell A.R. "Fluorescent antibody and histopathologic procedures for - Hog Cholera diagnosis" JAVMA 157 (9) 1234-1207.
28. Ressang A.A. Boer J.L. Den., 1968. "A comparison between the cell culture, frozen tissue section, impression and mucosal smear techniques for fluorescent antibody. Neth J. Vet. Sci. (1): 72-88
29. Ressang A.A. 1973. "Studies on the pathogenesis of Hog Cholera. Zbl. Vet. Med. B. 20:256-271.
30. Segre D. 1962. Detection Hog Cholera virus by a hemagglutination test. Am. Jour. Vet. Res. 23 (95): 748-750
31. Schwart L.N. Mathews J. 1964. Transmission of Hog Cholera via the respiratory tract.
32. Sappel W.H. 1949. "The Boyton pull smelter smear for diagnosing Hog Cholera"
33. Solórzano, R.F. 1969. The diagnosis of hog cholera by a fluorescent antibody test. J. Am. Vet. Assoc. 144 (6):

34. Sorenson D.K. y col. 1961. Clinical and hematological manifestation Hog Cholera. Univ. of Minn -- p. 29
35. Stair E.L. y col. 1964. "Fluorescent antibody for diagnosis of Hog Cholera. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 113: 656.
36. Taylor R.L. 1961. New laboratory test for Hog Cholera-diagnosis Vet. Med. 56:299-232.
37. Thorp. 1930. A study of leucocyte changes in the blood of diseases swine JAVMA. 77: 198-203.
38. Zinober, M.R. and Mott, L.O. 1966. Spreading characteristics of commercial anti Hog Cholera modified live virus vaccines in swine. Proc. 70 th. Ann Met. U.S. Livestock Sanit. Assoc.: 320.