

Determinación de la Infecciosidad y de la Capacidad
para Eliminar el Virus Virulento de Campo de
Diferentes Tipos de Vacuna Contra el Cólera Porcino.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A
RUBEN AGUIRRE FLORES



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.

Determinación de la Infecciosidad y de la Capacidad
para Eliminar el Virus Virulento de Campo de
Diferentes Tipos de Vacuna Contra el Cólera Porcino.

Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

RUBEN AGUIRRE FLORES

MEXICO 1972



A MIS PADRES

J. MATILDE AGUIRRE E. Y
Ma. TERESA FLORES DE A.

Por señalarme un camino con su
ejemplo.

A MIS HERMANOS

Alforso

Juan

Ismael

Catalina

Adalberto

Benjamin

Delia

Mario

Froylán y

Gema

Con agradecimiento y admiración
al M.V.Z. FERNANDO OLGUIN R.
por su valiosa ayuda en la realiza--
ción de este trabajo.

A MI HONORABLE JURADO

M.V. ALFONSO ANGUIANO T.

M.V.Z. RENE ROSILES

M.V.Z. ARTURO ENRIQUEZ Z.

M.V.Z. MICHAEL BEDOYA S.

M.V.Z. RICARDO MUÑOZ T.

A MIS MAESTROS

A

YOLANDA GONZALEZ DE LA TORRE

A mi natal comunidad rural

SAN ANTONIO "BRISÑO" JEREZ ZAC.

CONTENIDO

CAPITULO I	INTRODUCCION
CAPITULO II	MATERIAL Y METODOS
CAPITULO III	RESULTADOS
CAPITULO IV	DISCUSION
CAPITULO V	CONCLUSIONES
CAPITULO VI	BIBLIOGRAFIA

CAPITULO I

INTRODUCCION

La vacunación efectiva contra el cólera porcino ha sido grave problema para los investigadores de las enfermedades infecciosas de los animales domésticos. Hasta la fecha se conocen varios procedimientos para inmunizar a los cerdos contra esta enfermedad, como son:

- a).- La inoculación simultánea de virus virulento y suero hiperinmune.
- b).- La inyección de virus vivo modificado por diferentes procedimientos (lapinización y cultivo celular), con uso simultáneo o sin él de suero hiperinmune.
- c).- La vacunación con la suspensión de virus inactivado.

La vacunación con virus virulento ha quedado en desuso debido a las desventajas obvias que presenta; entre éstas, la inseguridad de producir inmunidad sin dañar a los animales inmunizados y que estos a su vez se conviertan en eliminadores del virus constituyendo un peligro para la población porcina susceptible.

La inmunización de los cerdos contra el cólera con suspensiones de virus vivo modificado es bastante efectiva y aparentemente no tienen

las desventajas del virus virulento (2); aunque algunos autores (13), (15) han puesto de manifiesto que el virus modificado del cólera porcino retiene cierta virulencia y los animales vacunados con el se constituyen en focos de infección (6), (9), (12); la inmunización con suspensiones de virus inactivado ofrece la posibilidad de formar animales sin que se infecten o se conviertan en focos de infección para la población susceptible (9).

El propósito de este trabajo, es comprobar si cerdos vacunados contra el cólera porcino con suspensiones de virus vivo modificado o inactivado, son capaces de transmitir la infección a cerdos susceptibles que entran en contacto con ellos, y si, cerdos que han sido vacunados una o más veces con diferentes tipos de vacunas, son capaces de inactivar totalmente al virus virulento de campo cuando entran en contacto con él.

CAPITULO II

MATERIAL Y METODOS

MATERIALES.

a).- Cuarenta y seis cerdos de la Granja Experimental Porcina de la F.M.V.Z., híbridos (Hamp-shire y York-shire) entre 15 y 18 kg de peso, hembras y machos de 10 semanas de edad, supuestamente libres -- del virus del cólera porcino (suposición basada en la práctica sanitaria de la explotación).

b).- Vacunas comerciales contra el cólera porcino, de tres tipos:

1.- Vacuna lapinizada de virus vivo modificado, para su uso simultáneo con suero hiperinmune.

2.- Vacuna de virus vivo modificado en cultivo celular para ser utilizado sin suero.

3.- Vacuna de virus inactivado (en glicerol y cristal violeta).

c).- Virus virulento de cólera porcino (cepa FMVZ A, 1970), aislada de un brote de campo en el Distrito Federal. Título 10^6 DL₅₀ en lechón por ml. que produce la muerte de 5 a 7 días. Esta cepa ha sido conservada por pases seriados en cerdos susceptibles, en el Departamento de

Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

d).- Cultivo primario de células de riñón de cerdo.

MÉTODOS.

a).- Prueba de la eliminación del virus vacunal.- Con cada una de las vacunas antes mencionadas, se vacunaron 3 grupos de cerdos - de 3 animales cada grupo, susceptibles, de 10 semanas de edad. Cada - grupo de cerdos, se pusieron inmediatamente después en contacto durante 7 días con otro grupo de 3 cerdos no vacunados y que no habían tenido - contacto previo con el virus.

Estos cerdos controles de contacto fueron observados clínicamente todos los días desde el primero al séptimo, para detectar cualquier síntoma atribuible a una infección contraída por el contacto con los cerdos vacunados.

Al final de los 7 días de observación, los cerdos controles - de contacto fueron sangrados para detectar anticuerpos en su suero, mediante la prueba de sero-neutralización in vitro.

Siete días más tarde, todos los cerdos controles fueron expuestos a 50^6 DL₅₀ del virus virulento del cólera porcino, para probar si había formado alguna resistencia después del contacto con los animales vacunados.

b).- Prueba de la resistencia adquirida después de la vacunación.- Veintiún días después de la vacunación.

Los animales de los 3 grupos, fueron sangrados y expuestos a 10^6 DL₅₀ del virus virulento del cólera por vía intramuscular. Durante los 14 días siguientes los animales fueron observados para detectar síntomas de cólera porcino con el suero sanguíneo de los animales vacunados, se hizo también la prueba de sero-neutralización in vitro, para determinar el título de anticuerpos que habían formado.

c).- Prueba de la eliminación del virus virulento después del desafío de la inmunidad conferida por la vacunación. Con cada uno de los tres tipos de vacunas, se vacunaron 2 nuevos grupos de 3 cerdos, susceptibles, de 10 semanas de edad cada uno. El primero de éstos recibió una sola vacunación y el segundo 2 vacunaciones a intervalos de 7 días. Un grupo adicional de 9 cerdos, dividido en subgrupos de 3 cerdos se vacunaron: el primer grupo una vez, el segundo grupo 2 veces y el tercer grupo 3 veces con la vacuna de virus inactivado a intervalos de 7 días, quedando entonces 3 grupos de animales que se vacunaron una, dos y tres veces. Veintiún días después de la segunda y tercera vacunación, todos los animales que habían sido vacunados fueron expuestos a 10^6 DL₅₀ del virus virulento por vía intramuscular.

Inmediatamente después de la exposición cada grupo experimen

tal (con 1, 2 ó 3 vacunas) se puso en contacto con un animal susceptible - diariamente durante los 5 días siguientes a la exposición. Estos últimos animales, sirvieron para probar si el virus virulento, se eliminaba de cerdos inmunizados una a más veces, con los diferentes tipos de vacunas.

d).- La prueba de sero-neutralización, se hizo siguiendo la - técnica descrita por Kumagai y colaboradores, la cual consiste en lo siguiente :

A un cultivo primario de células de riñón de cerdo, (cultivados en solución fisiológica de Hanks, con 0.5 ml. de lactoalbúmina y 10% de suero bovino en botella de farmacia), se le añaden 100 Dosis Infectante Cultivo Celular (DICC, del virus del cólera porcino, contenidas en 0.1 ml. Siete días más tarde se le añade al cultivo inoculado 100 DICC del virus - del Newcastle, el cual ejercerá una rápida acción sobre el cultivo celular, debido a la presencia previa del virus del cólera porcino. Esto constituye la prueba de exaltación de la enfermedad de Newcastle en cultivo celular, y es a la vez el control de la prueba de sero-neutralización.

Diluciones dobles de suero de un animal sospechoso se mezcla a volúmenes iguales con 100 DICC del virus del cólera porcino. Esta mezcla se incuba durante media hora a 37°C después del período de incubación, se inoculan a cultivos primarios de células de riñón de cerdo; 7 días más tarde se le añaden a los cultivos inoculados con la mezcla suero virus

100 DICC de virus de Newcastle. Si había anticuerpos en el suero del animal a probar, el virus de Newcastle no ejercerá su acción patógena tan rápidamente como en el caso del control.

En este trabajo se consideró el título de un suero como el recíproco de la dilución que inactivaba 100 DICC del virus del cólera porcino. El cálculo se hizo mediante el método de Reed y Muench.

CAPITULO III

R E S U L T A D O S

Los resultados de este trabajo se expresan en los cuadros I y -

IV.

Cuadro No. 1

Prueba de la eliminación del virus vacunal de cerdos inoculados con tres tipos de vacunas.

Tipos de vacunas	Vacunados sobre controles (x)	Animales vacunados y/o controles, con síntomas después de la vacunación. (7 días)	Número de animales no vacunados que mostraron anticuerpos en el suero a los 7 días del contacto. (xx)	Mortalidad de los animales control, cuando fueron expuestos al virus virulento (xxx)
Virus vivo - lapinizado.	3 3	0	3	2
Virus - vivo en cultivo celular	3 3	0	3	2
Virus - muerto, glicerol cristal - violeta.	3 3	0	0	3

Cuadro No. 1

(x) El numerador indica los animales vacunados; el denominador, los controles de contacto.

(xx) Se indica el número de animales controles no vacunados que mostraron anticuerpos después del contacto con los animales vacunados, mediante la prueba de neutralización in vitro.

(xxx) Los animales controles fueron expuestos al virus virulento catorce días después, para probar si se habían infectado con el virus contenido en los animales vacunados.

Puede notarse en este trabajo, que los animales vacunados con cualquiera de los dos tipos de vacunas a virus vivo modificado, eliminaron el virus de la vacuna, e infectaron a los controles, que a su vez formaron anticuerpos y una determinada resistencia.

Cuadro No. II

Resultados de la Sero-neutralización de los cerdos sin vacunar (control) - que entraron en contacto con animales vacunados.

tipo de vacuna	número de animales - probados	Número de animales con anticuerpos neutralizantes. (x)	Título de anticuerpos neutralizantes en los animales probados. (xx)		
			Animal No. 1	2	3
Virus vivo lapinizado mas suero inmune	3	$\frac{3}{3}$	< 40	< 30	> 60
Virus vivo en cultivo celular	3	$\frac{3}{3}$	> 30	> 60	> 40
Virus inactivo en gliceral y cristal violeta	3	$\frac{3}{3}$	0	0	0

(x) El numerador indica el número de animales reactivos, - el denominador indica el número de animales probados.

(xx) Título que se obtuvo mediante la prueba de Sero-neutralización in vitro.

Cuadro No. III.

Prueba de la resistencia adquirida después de la vacunación.

Tipo de vacuna	Número de animales - vacunados	Mortalidad en los animales - vacunados al - ser expuestos - al virus virulen - to. (x)	Porcentaje de sobrevivencia 14 días des--pués de la ex--posición.	Control para - probar la viru--lencia de la ex--posición de los animales no va--cuados.
Virus vi--vo lapi--nizado.	3	0	100	: : : : 100 % de : mortalidad : : : : : :
Virus vi--vo en - cultivo - celular	3	0	100	
Virus -- muerto - en glice--rol y cris--tal viole--ta	3	0	100	

(x) Los animales vacunados fueron expuestos a 10 DL_{50} a -- los 21 días después de la vacunación.

Puede notarse aquí, que los tres tipos de vacunas dieron resul--tados semejantes en cuanto a la resistencia a la exposición.

Cuadro No. IV

Presencia de anticuerpos neutralizantes en la prueba de resistencia adquirida después de la vacunación en los animales vacunados con diferentes tipos de vacunas contra el cólera porcino.

(x)

Tipo de vacuna	Número de animales - vacunados	Título de anticuerpos neutralizantes 21 días -- después de la vacunación.		
		Animal No. 1	2	3
Virus vivo lapinizado	3	> 64	> 60	> 60
Virus vivo en cultivo celular	3	> 60	> 64	> 60
Virus inactivado en glicerol y cristal violeta.	3	> 12	> 18	> 28

(x) Los animales fueron sangrados antes de la exposición al virus virulento.

Cuadro No. V

Prueba de la eliminación del virus virulento después del desafío de la inmunidad conferida por la vacunación en animales vacunados 1, 2 ó 3 veces - con diferentes tipos de vacunas.

Tipo de vacuna	Número de veces que se aplicó.	Número de animales vacunados.	Mortalidad en los animales controles, puestos en contacto con los vacunados, después de la exposición.					Total de animales	
			(x)						
			Los días	1	2	3	4	5	
Virus vivo liofilizado	1	3		+	+	+	+	+	5
	2	3		+	+	+	+	+	5
Virus vivo en cultivo celular	1	3		+	+	+	+	+	5
	2	3		+	+	+	+	+	5
Virus muerto - glicerol - cristal violeta.	1	3		+	+	+	-	+	4
	2	3		-	-	-	-	-	0
	3	3		-	-	-	-	-	0

(x) Los animales vacunados fueron expuestos al virus virulento a los 21 días después de la vacunación. Diariamente durante 5 días, - estos animales tenían contacto con un animal susceptible, el cual era retirado a las 24 hrs. a un local de aislamiento; habiéndose observado como se indica en el cuadro, que empezaron a morir a partir de las 24 hrs.

Este experimento revela que aún después de dos vacunaciones, el virus de exposición se elimina de los animales vacunados con virus vivo-modificado. Los animales vacunados resistieron la exposición pero presentaron viremia cuando se pusieron en contacto con el virus de campo (la viremia fué comprobada mediante la prueba de sero-neutralización in vitro).

Los animales vacunados 2 ó 3 veces con virus muerto, al entrar en contacto con el virus de campo, no lo eliminaron a juzgar por la ausencia de signos clínicos en los animales susceptibles de contacto.

CAPITULO IV

DISCUSION

Los 3 tipos de vacunas empleadas en este trabajo mostraron, que después de 21 días de haber sido administradas daban protección a los cerdos contra el virus virulento. Es sabido que las vacunas a virus vivo modificado necesitan producir la infección para provocar el estímulo antigénico que va a producir la inmunidad.

En los cuadros I y II, se demuestra que los animales que reciben el virus vivo modificado del cólera porcino, con el propósito de hacerlos inmunes, transmiten la infección a cerdos susceptibles que entran en contacto con ellos. Algunos autores (2), (5), (6), han demostrado, por medio de la técnica de anticuerpos fluorescentes, por la recuperación del virus en cultivo celular y por la inoculación a cerdos susceptibles con material de cerdos vacunados, que el virus modificado contenido en las vacunas contra el cólera porcino, pueden ganar virulencia y producir efectos letales. Aparentemente en este experimento, el virus vivo modificado de las vacunas no tuvo ningún efecto patógeno sobre los cerdos susceptibles de contacto.

Ha quedado demostrado que el tejido embrionario del cerdo, es

muy susceptible a la acción del virus del cólera porcino, ya sea que esté totalmente virulento o que haya sido atenuado en el laboratorio (5), (7). - Algunos investigadores (6), (7), (8), (14), sospechan que las cerdas inmunes son capaces de convertirse en focos de infección a través de su descendencia cuando se infectan durante cierta época de la preñez y los lechones son capaces de nacer normales. Carbréy (2), ha reportado que en la estación experimental de Iowa se ha descubierto un estado de inmunotolerancia en el cual los cerdos que entran en contacto con el virus modificado de las vacunas, poco antes de nacer o uno o dos días después del nacimiento eliminan grandes cantidades del virus, con una virulencia comparable, y a veces mayor que la del virus de campo sin modificar. Los cerditos mueren súbitamente con síntomas y lesiones del cólera a los 30 días de edad, tiempo en que desarrolla su sistema inmunitario. Esto, evidentemente es una seria amenaza para los cerdos susceptibles que entran en contacto con ellos. El mismo autor ha reportado un estado de portador persistente en aquellos animales que han entrado en contacto con el virus virulento ó el virus vivo modificado in útero de cerdas inmunes, poco antes del término de la gestación.

Algunos virus como el de la corio-meningitis linfocitaria de los ratones, son capaces de provocar la formación de portadores eliminadores del virus de por vida; cuando la infección se hace durante el primero ó segundo día de edad, en que el sistema inmunitario del ratón no se ha desa-

rollado. Si la infección con el virus de la corio-meningitis linfocitaria se lleva a cabo cuando el ratón tiene su sistema inmunitario maduro, la reacción es la de una infiltración linfocitaria en el tejido nervioso con síntomas de encefalitis y gran mortalidad. Pero si al mismo tiempo que se realiza la infección se aplica una droga inhibidora del sistema inmunitario la reacción general es, la creación de portadores eliminadores del virus de por vida (5). Entonces parece ser, que la infiltración linfocitaria provocada por la infección del virus, es la que produce la reacción fatal. Este mismo mecanismo podría explicar la creación de portadores eliminadores del virus del cólera porcino por un largo tiempo, de aquellos cerdos que entran en contacto con el virus cuando aún no han desarrollado su sistema inmunitario.

Cuando los cerdos se inmunizan una sola vez por cualquiera de los procedimientos en uso, y posteriormente entran en contacto con el virus virulento, resisten la acción patógena de este último pero lo eliminan durante algún tiempo aún no determinado. En el cuadro V puede observarse que esta eliminación puede durar 5 días o más, lamentándose no haber continuado la detección del virus durante más tiempo para determinar la formación de portadores eliminadores persistentes.

Los cerdos vacunados dos o más veces con vacuna a virus inactivado no eliminaron, al menos en cantidades detectables el virus virulen

fo de exposición como se muestra en el cuadro V. Loan y Rodabaug (13), han reportado en un trabajo sobre los anticuerpos neutralizantes que se producen en los cerdos después de la vacunación con diferentes tipos de vacunas contra el cólera porcino, que la inyección de vacunas a virus vivo modificado y la administración simultánea de virus virulento y suero inmune, provocan la formación de altos títulos de anticuerpos neutralizantes en cerdos inmunizados, en contraste con la aparición de títulos bajos en cerdos que recibieron vacuna a virus inactivado. Estos resultados se confirman en este trabajo como se muestra en el cuadro No. IV.

Todos los cerdos que fueron vacunados con cualquiera de los productos inmunizantes resistieron la exposición al virus virulento, mostrando sin embargo, títulos de neutralización muy diferentes en los animales vacunados con virus vivo y aquellos vacunados con virus inactivado. Esto indica que el mecanismo por el cual se produce resistencia es efectivo.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

1.- El virus vivo modificado para la vacunación de los cerdos contra el cólera porcino, resultó en la eliminación de dicho virus en cantidad suficiente para infectar a cerdos susceptibles que entraron en contacto con los animales vacunados.

2.- La vacunación de los cerdos contra el cólera porcino con vacuna a virus modificado o con virus inactivado, resultó en una inmunidad sólida 21 días después de la vacunación a juzgar por la resistencia a la exposición con 10^6 DL₅₀ de virus virulento.

3.- Cuando cerdos que habían sido vacunados dos o más veces con vacunas a virus inactivados fueron expuestos con 10^6 DL₅₀ de virus virulento del cólera porcino, no se detectó eliminación de éste último, indicando que las vacunas tipo virus inactivado provocan una respuesta de tal naturaleza que inactiva totalmente in vivo al virus virulento.

4.- Cuando cerdos que habían sido vacunados una o dos veces con vacuna a virus vivo modificado, fueron expuestos con 10^6 DL₅₀ de virus del cólera porcino; resistieron la exposición pero eliminaron este último

virus virulento en cantidad suficiente para causar la infección y la muerte que entraron en contacto.

CAPITULO VI

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Beall. et. al. 1964, "Hog cholera eradication program in lowndes country"., Final Progres Report, U.S., Liverstock Sanit. Assn P.-284a.
- 2.- Carbrey, et. al. U.S.D.A., 1969., "Simposio de los factores que producen muerte y aborto". The Agricultural Reserch., 35; 220.
- 3.- Carbrey., et. al. 1965a. "The role of immune tolerance in transmisson of Hog Cholera"., Jor. Amer. Vet. Med. Assn. 146: 233.
- 4.- Carbrey and Yuong, S.H. 1966 a., "The changing picture of Hog Cholera". Case studies. Jour. Amer. Vet. Med. vol. 149 : 1720.
- 5.- Cowart, W.O., and Morehouse, L.G. 1967., "Effects of attenuaded Hog Cholera virus in pregnat swine at various stages of gestation"., Jour. Amer. Vet. Med. vol, 151 p. 1788.
- 6.- Dune and Clark, . 1968. "Transmition of Hog Cholera"., - Amer. Jour. Vet. Res. 29: 786.

- 7.- Dune, H.W. 1961 b, . "Brecks. Following vaccination with attenuated Hog Cholera vaccines", . Jour. Am. Vet. Med. 38: 311.
- 8.- Dune, H.W. 1961 a, . "The diagnosis of Hog Cholera". -- Proc. 65th. Ann. M. U.S. Livestock. Sanit. p. 478.
- 9.- Huck, R.H., and Aston, F.W.: 1964. "The carrier sow in swine fever", . Vet. Res. 76: 1151.
- 10.- Korn, G. 1963. "Distribution of swine fever including - virus strains of low virulence". Abst. Vet. Bull. 34; 24.
- 11.- Loan R.W. and Storm, . "Propagation and transmission of -- Hog Cholera virus in non porcine host". Amer. Jour. Vet. Res. V. 26 p. 110.
- 12.- Loan, R.W. and Gustafson, 1964, . "Cultivation Hog Cholera virus in sub-culturable swine buffe coat cels", . Amer Jour. Vet. -- Res. v. 25 p. 1120.
- 13.- Loan, R.W. 1965. "Increased sensitivity of the E.N.D. test for Hog Cholera virus", . Amer. Jour. Vet. Res. v. 26 p. 1110.
- 14.- Loan, E.W. and Rodabaugh. "Serology studies in Hog -- Cholera immunization". Amer. Jour. Vet. Res. vol. 27 pág. 1333.

15.- Young, G.A., and Kitchell, R.L. 1955. "The effect of viral and other infections of the dam on fetal development in swine. I. -- Modified live Hog Cholera viruses immunological, virological and gross pathological studies". Jour. Amer. Vet. Res. vol. 126, p. 165.