



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN



"EVALUACION DE UN INMUNOGENO DE
PSEUDORRABIA Y *Actinobacillus*
pleuropneumoniae EN CERDOS
LIBRES DE PATOGENOS
ESPECIFICOS (S. P. F.)."

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A N
MANUEL FERNANDEZ BARAJAS
JESUS HORACIO LARA PUENTE

DIRECTORES: DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO
ASESORES: DR. SUSANA MENDOZA ELVIRA
DR. JORGE LUIS TORTORA PEREZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

TESIS CON 1994
FALLA DE ORIGEN



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 está 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

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

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



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

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

"Evaluación de un inmunógeno de Pseudorrbio y Actinobacillus pleuropneumoniae en cerdos libres de patógenos específicos (S.P.F.)"

que presenta el pasante: Manuel Fernández Borajas
con número de cuenta: 8656108-0 para obtener el TITULO de:
Médico Veterinario Zootecnista ; en colaboración con:
Jesús Horacio Lara Puente

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 28 de Abril de 1994

PRESIDENTE M.V.Z. José Abel Ciprián Carrasco

VOCAL M.V.Z. Sergio Cortés Huerto

SECRETARIO DV.MC. Jorge Luis Tórtora Pérez

PRIMER SUPLENTE M.V.Z. Tonatliuh Cruz Sánchez

SEGUNDO SUPLENTE M.V.Z. Raúl Rodillo Rodríguez



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES - CUAUTITLÁN



DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FEB-CUAUTITLÁN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

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

"Evaluación de un Inmunógeno de Pseudorrabia y Actinobacillus pleuropneumoniae en cerdos libres de patógenos específicos (S.P.F.)"

que presenta el pasante: Jesús Horacio Lara Puente
con número de cuenta: 8322658-8 para obtener el TÍTULO de:
Médico Veterinario Zootecnista ; en colaboración con :
Mahuel Fernández Borajas

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXÁMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 28 de Abril de 1994

PRESIDENTE M.V.Z. José Abel Ciprián Carrasco

VOCAL M.V.Z. Sergio Cortés Huerto

SECRETARIO DV. MC. Jorge Luis Tórtora Pérez

PRIMER SUPLENTE M.V.Z. Tonatiuh Cruz Sánchez

SEGUNDO SUPLENTE M.V.Z. Raúl Radillo Rodríguez

A mis padres por todo su cariño, apoyo y enseñanzas, que me han dado en la vida, no tengo mejor herencia que los principios y educación que me han dado.....Gracias. los quiero.

A mi esposa, Angélica por todo su amor, comprensión y paciencia, te amo.

A mi hijo Manuel, por ser lo más extraordinario que me ha dado la vida, por quien me superare día a día. Te quiero pequeño.

A mi tía Milagros por todo su cariño, consejos y apoyo. Gracias Tía.

A mi padrino Baudelio, por ser para mi alguien muy importante. Gracias padrino.

Aunque ya no esten con nosotros dedico esta tesis también a mis abuelitas, Ernestina y Elvira, que estarían muy contentas y orgullosas. Desde aquí les doy todo mi amor.

Manuel

A todos mis amigos, Horacio, Daniel, Lilia, Alejandra Ayanegui, Alejandra Ramírez, Ana Ceci, Ana Laura, Carlos, Paco, Alejandro y Mauricio, por su amistad y ayuda que en un momento me dieron y que mutuamente nos seguiremos dando. Los quiero.

A mis hermanas Paulette, Angélica y Karla, por su cariño y aliento. Las quiero.

A mis suegros, Raymundo y Evangelina, por hacerme sentir su amigo y parte de su familia. Los quiero y gracias.

Manuel

Doy gracias a Dios por haberme concedido el permiso y la vida necesaria para poder realizar mi carrera.

A mis padres, por darme la oportunidad de ser su hijo y demostrarme lo que es una familia.

A tí Jesús no solo por el apoyo económico y material que me brindaste, sino por ser más que un ejemplo de honestidad , amor, trabajo y perseverancia. Te quiero.

A tí Teodito, por soportarme en mis caprichos y por las enseñanzas que solo tú, me podías brindar. Te quiero.

A mis abuelos, Jesús, Soledad, Diego y Ma. de la Luz, que de seguro estarían muy emocionados y contentos. Dios los tenga a su lado.

A mis hermanos, Ma. de la Luz, Carlos, Oralia Margarita, Evaristo Filemón y Argelia, por el apoyo brindado, que aunque no lo crean me impulso cada día.....Gracias.

A mis sobrinas, Gabriela, Fernanda y Sofia, a Jesús, los cuales me brindaron la alegría necesaria para continuar. Los quiero.

A mi tía conchita y mi tío José, por sus sabios consejos. Dios los cuide

Jesús Horacio

A mi inseparable compañera de innumerables desvelos, estudios, alegrías y enfados. Goldie, te quiero.

A Dora Alicia, no solo por llegar a ocupar un lugar especial en mi corazón, sino también por su paciencia y enseñanzas. Y por lo que te espera.....Te amo.

A mis compañeros y amigos de la carrera, Manuel (el güero), Daniel (el negro), Mauricio (la funda) , Francisco (paco), Alejandro (el abuelo), Enrique, Carlos, Alejandra Ayanegui (la nayeli), Alejandra Ramírez, Ana Cecilia, Ana Laura, por su amistad y buenos consejos. Los estimo y admiro, gracias.

Jesús Horacio

Agradecemos muy sinceramente al Dr. José Abel Ciprián Carrasco por toda su ayuda, colaboración y conocimientos que nos prestó para la elaboración de esta tesis. Primordialmente apreciamos su gran amistad.

Gracias MAESTRO y AMIGO.

De igual manera damos las gracias por su ayuda y amistad al Dr. Jorge Tórtora y al cDr. Susanita Mendoza. Realmente apreciamos su colaboración.....Gracias.

A todo el personal del CENID-Microbiología, que de una u otra manera contribuyeron a la realización de esta tesis. Gracias.

Justo es agradecer también a todos y cada uno de los profesores que tuvimos en la carrera. Gracias por sus conocimientos y enseñanzas.

Horacio / Manuel

CONTENIDO

Resumen	a
Lista de cuadros	b
Lista de figuras	c
1. INTRODUCCION	1
1.1. Generalidades	1
1.2. Pleuroneumonía Contagiosa Porcina	5
1.2.1. Antecedentes	5
1.2.2. Características de <i>A. pleuropneumoniae</i>	7
1.2.3. Patogenia y signología	8
1.2.4. Lesiones	9
1.2.4.1. Macroscópicas	9
1.2.4.2. Microscópicas	10
1.2.5. Diagnóstico	10
1.2.6. Prevención y control	11
1.2.6.1. Vacunación	11
1.2.6.2. Antibióticos	17
1.3. Virus de la Enfermedad de Aujeszky	19
1.3.1. Antecedentes	19

1.3.2.	Características de la enfermedad	19
1.3.3.	Prevención y control	23
1.3.3.1.	Vacunación	24
1.4.	Interacción virus-bacteria en la presentación de las neumonías	29
1.4.1.	Sinergia entre VEA y <i>A. pleuropneumoniae</i>	32
2.	OBJETIVO	35
2.1.	Planteamiento del objetivo general	35
2.2.	Objetivos particulares	35
3.	MATERIAL Y METODOS	36
3.1.1.	Animales	36
3.1.2.	Instalaciones	36
3.1.2.1.	Centro piloto de producción de cerdos S.P.F.	36
3.1.2.2.	Zona de aislamiento	37
3.1.2.3.	Cámara de nebulización para el desafío experimental	39
3.1.3.	Alimento	41
3.1.4.	Microorganismos	41
3.1.4.1.	Virus de la Enfermedad de Aujeszky	41
3.1.4.2.	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	41

3.2.	Métodos	41
3.2.1.	Preparación de los inmunógenos	43
3.2.1.1.	Obtención del virus	43
3.2.1.2.	Elaboración de la cepa bacteriana	43
3.2.1.3.	Elaboración del inmunógeno bivalente	43
3.2.1.4.	Control de calidad	44
3.2.2.	Diseno experimental	44
3.2.3.	Vacunación de los diferentes grupos con VEA y <i>A. pleuropneumoniae</i>	45
3.2.4.	Desafío con el virus de la Enfermedad de Aujeszky	45
3.2.5.	Desafío con el <i>A. pleuropneumoniae</i>	46
3.2.6.	Sacrificio y necropsia	46
3.3.	Evaluación de las lesiones macroscópicas	46
3.3.1.	Evaluación de las lesiones pulmonares por planimetría	46
3.4.	Toma de muestras	46
3.4.1.	Histopatología	46
3.4.2.	Recuperación del agente	48
3.4.2.1.	Recuperación e identificación del App.	48

3.4.2.2.	Identificación del virus de la Pseudorrabia	48
3.5.	Obtención de sueros	49
3.5.1.	Fecha de sangrado en los grupos experimentales	49
3.6.	Pruebas serológicas	50
3.6.1.	Prueba de Pleurotest	50
4.	RESULTADOS	51
4.1.	Instalaciones	51
4.1.1.	Centro piloto de producción de cerdos S.P.F.	51
4.1.2.	Unidad de aislamiento	51
4.2.	Animales	51
4.2.1.	Parámetros reproductivos de las hembras del centro piloto	52
4.3.	Inmunógenos	53
4.3.1.	Control de calidad de la vacuna	53
4.4.	Signos clínicos posvacunación.	54
4.5.	Signos clínicos posdesafío	54
4.5.1.	Signos clínicos observados posdesafío en los diferentes grupos	54
4.5.2.	Registro de la temperatura corporal	55

4.5.2.1.	Registro de temperaturas corporales promedio de los grupos	55
4.6.	Evaluación en los animales sacrificados	56
4.6.1.	Lesiones macroscópicas	56
4.6.1.1.	Lesiones macroscópicas pulmonares por grupo	60
4.6.2.	Lesiones microscópicas por grupo	61
4.7.	Recuperación e identificación de los agentes inoculados	68
4.7.1.	Identificación del virus de la Enfermedad de Aujeszky	68
4.7.2.	Aislamiento e identificación de <i>Actinobacillus</i> <i>pleuropneumoniae</i>	70
4.8.	Serología	71
4.8.1.	Prueba de Pleurotest	71
5.	DISCUSION	74
6.	CONCLUSIONES	83
7.	BIBLIOGRAFIA	85

RESUMEN

La finalidad de este trabajo fue la de evaluar un inmunógeno bivalente, con el VEA y el App. en cerdos, los parámetros para la evaluación del producto en los animales desafiados fueron; temperatura rectal, signos respiratorios, porcentaje de lesión pulmonar (macro y microscópica), serología contra el VEA y aislamiento bacteriano.

El estudio se realizó con 20 lechones de 1 mes de edad, obtenidos del centro piloto de producción de cerdos S.P.F., a fiebre porcina clásica, VEA, Paramixovirus porcino y Pleuroneumonía Contagiosa Porcina, se formaron 5 grupos con 4 lechones cada uno tomados al azar: grupo 1 (vacunado contra el VEA y desafiado contra la misma), grupo 2 (vacunado contra App. y desafiados contra el mismo), grupo 3 (vacunado contra el VEA, desafiados contra la misma y App.), grupo 4 (sin vacunar y desafiados con App.), grupo 5 (vacunado contra VEA y App. y desafiado con los mismos) que fue el grupo de evaluación del inmunógeno bivalente.

El día 1 se vacunaron los grupos 1,2,3 y 5, el desafío con el VEA fue el día 10, a los grupos 1, 3 y 5 con una dosis de 1800 DICT (TCID), con 2 ml. intranasalmente, el día 14 se desafío con App. a los grupos 2, 3, 4 y 5, por medio de una cámara de nebulización a una dosis de 3×10^8 bacterias/ml. (total 14 ml. en 30 minutos).

Los grupos 1, 2, 3 y 5 manifestaron anorexia, postración, ligera disnea, y una ligera hipertermia. Los signos clínicos observados posdesafío fueron los siguientes: grupo 1 manifestó disnea, anorexia, elevación de la temperatura corporal hacia el día 11 hasta el 18, el grupo 2 presentó una marcada anorexia, disnea, postración y un incremento en la temperatura corporal del día 14 al 21, del grupo 3 un solo individuo mostro signos de disnea a los 5 días y todo el grupo manifestó un ligero aumento en la temperatura corporal hacia el día 14, por lo que respecta al grupo 4 presentaron signos de tipo neumónico y elevación de la temperatura corporal del día 14 al 18, en el grupo 5 los signos antes descritos fueron marcados en forma mas leve y se presentaron dos picos de ligera hipertermia, uno hacia el día 10 y otro el día 15. A la necropsia, sólo se encontró daño en el aparato respiratorio del grupo 2, con un 8 % de lesión pulmonar, del tipo fibrino hemorrágico agudo con adherencias pleurales, grupo 3, 25 a 30 % de lesión pulmonar del tipo pleuroneumónico crónico, el grupo 4 presento un 17 % de superficie pulmonar danada con lesiones del tipo pleuroneumónico crónico por lo que respecta al grupo 5 solamente dos animales presentaron lesiones con un 7 % de lesión pulmonar, de tipo consolidativa con adherencias.

Por medio de la técnica de anticuerpos fluorescentes se determino la presencia de VEA en pulmón, corazon, riñón, hígado, bazo, y encéfalo, resultando negativa para todos los grupos en los primeros 5 órganos, y por lo que respecta a el encéfalo se óo 2 negativo, grupo 3 4/4 positivos a la inmunofluorescencia, grupo 4 negativo, grupo 5 4/4 positivos. En el aislamiento e identificación del App. se encontró que el grupo 1 fue negativo, el grupo 2 en 1/4 fue posible el aislamiento de *A. pleuropneumoniae*, el grupo 3 4/4 aislamientos e identificaciones del mismo, grupo 4 se aisló e identificó el microorganismo en 2/4 muestras, grupo 5 solamente en 1/4 muestras se recuperó el agente, las recuperaciones cuando fueron positivas se realizaron a partir de los pulmones de los animales de los diferentes grupos, siendo negativas en todos los grupos los aislamientos a partir de corazón, riñón, hígado y bazo. En la evaluación serológica contra el App. se utilizó el kit de PLEUROTTEST_{MR.} encontrándose lo siguiente: grupo 1 negativo durante los 6 sangrados, grupo 2 positivo a partir del 4o. sangrado, de igual forma el grupo 3, 4 y 5 (solamente a el serotipo 1).

En base a los datos anteriores se determina que la vacunación contra el VEA y el desafio con VEA y App. se ven mas afectados que los no vacunados contra el VEA, también se encontró que los animales vacunados contra el App. no morían, pero presentaban signos y lesiones típicas de pleuroneumonía. Así mismo se encontró que los animales no vacunados y desafiados con App. presentaban signos neumónicos y lesiones (grupo 4) pero en menor grado que los vacunados con el VEA y desafiados con el mismo y App. (grupo 3), demostrándose una sinergia entre los dos agentes.

Por lo que respecta a los animales que fueron vacunados con el inmunógeno bivalente y desafiados con el VEA (grupo 5) presentaron menos signos clínicos y menor grado de lesión pulmonar.

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Diagrama del experimento.....	47
2 Lesiones macroscópicas.....	62
3 Lesiones microscópicas.....	69
4 Identificación del virus de la Enfermedad de Aujeszky por anticuerpos fluorescentes.....	72
5 Recuperación de <u>A. pleuropneumoniae</u> a partir de diferentes tejidos.....	73

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Centro piloto de cerdos S.P.F.....	38
2 Unidad de aislamiento.....	40
3 Vista isomérica de la cámara de nebulización.....	42
4 Medias de temperatura de los grupos 1 y 2	57
5 Medias de temperatura de los grupos 3 y 4	58
6 Medias de temperatura del grupo 5	59
7 Planimetría dorsal y ventral de las lesiones macroscópicas del grupo 1.....	63
8 Planimetría dorsal y ventral de las lesiones macroscópicas del grupo 2.....	64
9 Planimetría dorsal y ventral de las lesiones macroscópicas del grupo 3.....	65
10 Planimetría dorsal y ventral de las lesiones macroscópicas del grupo 4.....	66
11 Planimetría dorsal y ventral de las lesiones macroscópicas del grupo 5.....	67

1.- INTRODUCCION

1.1 Generalidades

Desde la antigüedad, la carne ha sido y es al presente un factor importante en el desarrollo de los pueblos (*Salinas, 1960.*).

Indudablemente que los primeros seres humanos del mundo fueron originalmente vegetarianos; pero la lucha por la supervivencia los obligó a la cacería y como derivación inmediata al consumo de los despojos de aquellos animales que les proporcionaron alimentos que no encontraban fácilmente en diferentes épocas del año (*Salinas, 1960.*).

La cacería obligó al hombre a improvisar y mejorar sus armas y medios para atrapar a los animales, y posteriormente a la domesticación de los mismos (*Salinas, 1960.*).

Algunos autores consideran que el cerdo fué el primer animal en domesticarse, otros por el contrario piensan que primero se domesticó a los bovinos, posteriormente los ovinos y los caprinos y por último a los suinos; lo cierto es que ésto sucedió hace algunos 10,000 años, casi con seguridad en algún lugar de Asia.

En si, el cerdo y su carne han tenido altibajos durante toda su historia en relación con el ser humano mientras que por un lado los Cretenses lo consideraban

un animal divino por que decían que había alimentado a Júpiter, y los Francos e Ibéricos imponían severas multas y castigos al que robara un cerdo. Moises en sus tablas prohíbe el consumo de carne de cerdo por considerar que transmitía la lepra (Flores, 1979).

Es aceptable que en la antigüedad haya habido restricciones a un mayor consumo, pues no existía inspección sanitaria y el cerdo era criado en condiciones inadecuadas de higiene. Aún en nuestros días existen arraigos dogmáticos que bloquean el consumo de la carne de cerdo como es el Islamismo. Las prohibiciones dogmáticas se originaron por que el cerdo puede transmitir al hombre varias enfermedades, pero también se debe de considerar que en nuestros días no existe ninguna razón científica que justifique una limitación del consumo de carne porcina.

En ciertos países la carne de cerdo es mas popular que la de bovino, debido a que el costo es mucho menor. En los países subdesarrollados el cerdo representa un importante factor en la dieta de las poblaciones rurales de poco poder adquisitivo, pues es difícil que un agricultor no tenga por lo menos un animal para su consumo (Pinheiro, 1973).

En México existe una mala distribución de los alimentos pues según estudios especializados, el 18% de los mexicanos se alimentan adecuadamente,

mientras que el 82% restante sufre de algún tipo de desnutrición o malnutrición (Martínez, 1977).

Como hemos visto, el cerdo se ha enfrentado a diversos problemas durante su historia, ya que en el país existen otros tipos de problemas en la producción porcina, dentro de los cuales podemos mencionar el costo del alimento que aproximadamente representa un 65 % - 80 % de la inversión total. Por lo tanto la eficiencia económica de la granja dependerá de que los costos se mantengan al mínimo. Pero también debemos de tomar en cuenta otros puntos que nos pueden alterar de forma significativa los costos, como son: alimentación balanceada adecuadamente, instalaciones propias para la explotación porcina y el manejo de los animales y por último la ausencia de enfermedades.

De los puntos anteriores podemos ubicar el referente a la baja prevalencia de las enfermedades, puesto que la presentación de las neumonías en estos animales merman considerablemente la economía de los productores porcinos, debido a que afectan los parámetros de producción como: ganancia de peso, conversión alimenticia y eficiencia alimenticia, para entender esto explicaremos que en el período comprendido de 1977 a 1989 el porcentaje de decomisos por causas neumónicas aumento de un 18% a un aumento alarmante del 31% (Icaza, 1989) ,encontrándose principalmente lesiones características de Pleuropneumonía Contagiosa Porcina, Pasterelosis pulmonar y lesiones diversas. Como se puede

observar el incremento por decomisos en el rastro por las causas neumónicas ha ido en aumento, encontrándose como principal enfermedad a la Pleuroneumonía Contagiosa Porcina, la cual en la actualidad toma un papel importante en cuanto a las pérdidas económicas originadas por el decomiso en el rastro y dentro de la producción misma, el problema clínico acarrea una inadecuada conversión alimenticia y un gasto extra en el tratamiento de la enfermedad, si a esto le aunamos que la enfermedad se ve exacerbada cuando se combina con otros agentes etiológicos como: Enfermedad de Aujeszky, Fiebre Porcina Clásica, Pastereiosis Pulmonar y otros, la situación se agrava aún más.

Los problemas neumónicos hoy en día son la causa más importante de pérdidas económicas para el productor porcino, ya sea como decomiso en rastro o por una deficiente conversión alimenticia. La Pleuroneumonía Contagiosa Porcina ha ido en aumento desde que se tienen reportes de su aparición en 1976 por Ramírez Necochea, la cual actualmente podemos asegurar que existe en todas las cuencas porcinas del país. (*Pijoan 1987*).

1.2 Pleuropneumonia contagiosa porcina:

1.2.1 Antecedentes

En 1961 en la Plata Argentina se observó un fuerte brote de una enfermedad muy grave con sintomatología respiratoria, causando la muerte a un gran número de animales en 3 granjas diferentes (*Shope 1964*).

La mayor mortalidad se observó en animales entre 30 y 60 kg., pero también en hembras reproductoras de diferentes razas e indistintamente si estaban o no vacunadas contra el Cólera Porcino.

Los signos respiratorios eran primordialmente en una dificultad para respirar, salida de sangre por nariz y boca en forma de espuma sanguinolenta y muerte dentro de las primeras 24-48 horas.

Después de haber comenzado los signos los animales que resistieron por más de 4 días sobrevivieron. La enfermedad se controló con terramicina. Los cerdos que murieron presentaron a la necropsia una neumonía lobular extensa con pleuritis fibrinosa.

En los E.U. Shope realizó el análisis de los pulmones de los cerdos procedentes del brote de la enfermedad en Argentina, logrando reproducir la enfermedad en cerdos centinelas inoculados intranasalmente con un macerado de dichos pulmones. El cerdo presentó un cuadro similar de disnea y temperatura de

41.5°C y murió en 24 horas. Sus pulmones revelaban pleuropneumonía muy similar a la presente en Argentina.

En México en la década de los 70's se presentaron brotes violentos de neumonías en granjas porcinas del bajo y estado de Tlaxcala. La morbilidad era de un 80-90 % con mortalidad del 10-30 % . El problema comenzó en los cerdos adultos, quedando posteriormente como un problema enzoótico de los lechones.

La enfermedad tiene una distribución mundial según los estudios de diversos investigadores. Los primeros reportes de la enfermedad en México, los hace Ramírez Necochea quien describe la enfermedad en 1976 y Pijoan y col. realizan estudios y aislamientos exhaustivos en 1978 de brotes originados en Tlaxcala, La Piedad y Penjamo. En el 50 % de los pulmones de Tlaxcala y 21.7% de los de La Piedad se obtuvo crecimiento de colonias β hemolíticas que fueron clasificadas como *Haemophilus parahemolyticus*.

El agente etiológico es considerado hoy en día como *Actinobacillus pleuropneumoniae* debido a los estudios sobre las bases fenotípicas y sobre el DNA de estas bacterias (Pohl y col. 1983.).

1.2.2 Características de *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Actinobacillus pleuropneumoniae es una bacteria Gram negativa, pleomórfica pero se observa generalmente en forma de bacilo corto y encapsulado de aproximadamente 0.5 a 1.5 μm de largo por 0.3 μm de ancho, carece de flagelos lo que determina su inmovilidad y no es capaz de esporular. Es aerobio y anaerobio además depende del factor V de crecimiento conocido como NAD (Nicotinamin Adenin Dinucleótido) y no depende del factor X ó hemina.

En cultivos de Agar sangre con cepas nodrizas de *Staphylococcus aureus*, hay crecimiento de colonias muy pequeñas menores de 1 μm . blanquecinas y brillantes de aspecto mucoso.

Existe una variedad de *Actinobacillus pleuropneumoniae* que no es dependiente del NAD, antes conocido como *Pasteurella Haemolytica* like y actualmente conocido como *Actinobacillus* biovariedad 2 no dependiente del NAD.

Se conocen actualmente alrededor de 10 serotipos en base a sus antígenos capsulares y se asignan con números arábigos del 1 al 10 (Gunnarson y col. 1977), (Rossendal y Boyd, 1982), (Nielsen y O'connor, 1984), (Nielsen 1985).

El *A. pleuropneumoniae* secreta una toxina hemolítica que es también un factor de virulencia, además los lipopolisacáridos (LPS) o endotoxinas, algunas

proteínas membranales, fimbrias y una toxina citotóxica para macrófagos que vienen siendo todos los factores antigénicos de la bacteria (Pijoan 1988).

1.2.3 Patogenia y signología

La vía de entrada del *A. pleuropneumoniae* al organismo es por vía aerógena. El periodo de incubación de la enfermedad es corto experimentalmente es menor a 6 horas, aunque en condiciones de campo varía entre 12-24 horas (Shope 1964, Nielsen 1970 y Mylrea 1974).

La mortalidad y la morbilidad observadas durante un brote de Pleuropneumonia Contagiosa Porcina (PCP) varían mucho dependiendo si la pira ha sido infectada anteriormente con *A. pleuropneumoniae* o es una enfermedad nueva dentro de la explotación (Pijoan y col. 1982).

Nielsen reporta una morbilidad del 8.5 al 40 % y mortalidad del 0.4 al 24 % en Dinamarca en 1970.

Es importante conocer que la morbilidad en PCP varía por:

- Edad de los animales.

- La mayoría de los brotes detectados han sido en cerdos de 30 a 50 kg. (3 a 4 meses de edad).

- Ocasionalmente se difunde a animales adultos (hembras de vientre) donde logra ocasionar bajas, esto es reflejo del grado de inmunidad existente en el hato.

Signos clínicos:

Los signos clínicos varían dependiendo del grado de severidad en que se presente la enfermedad y puede ir desde una septicemia sobreaguda con temperatura de 41-42° C, cianosis de la piel, abdomen y orejas, hemorragias y espuma en la nariz y ocasionalmente en boca, también hay chillidos agudos con la presencia de opistotonos y muerte. O presentarse en animales de una forma muy benévola en forma de pleuropneumonía donde los cerdos presentan: anorexia, disnea con hiperpnea, posición de perro sentado con la boca abierta, cianosis en orejas y extremidades, tos breve, vómito ocasionalmente y posteriormente la muerte que puede presentarse de uno a cuatro días con presentación de una hemorragia nasal, o bien puede haber una recuperación espontánea (Pijoan y col. 1982).

1.2.4 Lesiones

1.2.4.1 Macroscópicas

Las principales lesiones macroscópicas encontradas en cerdos con PCP son : pericarditis, hidropericardio, hidrotorax con líquido sanguinolento, hemorragias en miocardio, adherencias pleurales (viscerales y parietales), infarto rojo en lóbulos diafragmáticos, friabilidad en la zona infartada del pulmón, extensas zonas congestionadas de color oscuro y consistencia frías.

1.2.4.2 Microscópicas

Las lesiones microscópicas son: zona de infarto, edema alveolar, infiltración peribronquial y perivascular de células mononucleares (Linfocitos y Macrófagos), hemorragias en alveolos y la presencia de fibrina intraalveolar.

También hay lesiones de tipo crónico características por ser un proceso encapsulado.

1.2.5 Diagnóstico

Para lograr un correcto diagnóstico de la PCP uno se puede ayudar de la observación de los signos clínicos individuales y de grupo, observación de las lesiones a la necropsia, aislamiento del *A. pleuropneumoniae* de lesiones neumónicas y pruebas serológicas en los cerdos vivos de las granjas (Ciprián 1990).

El uso de la observación del brote y de las lesiones determinadas en la necropsia ayudan al Dx., pero no detectan casos crónicos de la enfermedad, por otro lado el aislamiento y tipificación del agente causal tarda de 2 a 3 días y se requiere de los servicios de un laboratorio de confiabilidad adecuada. Es por ello que el método de Dx. más adecuado es el serológico por poder aplicarse a cerdos vivos con o sin signos aparentes.

Pruebas serológicas para PCP

Aglutinación, aglutinación con partículas de látex, aglutinación en tubo con 2 mercaptoetanol, hemoaglutinación indirecta, fijación del complemento, ELISA, coaglutinación y aglutinación en placa "PLEUROTEST" (Marca Registrada por la U.N.A.M.)

Esta última prueba ha sido desarrollada en México por Ciprián y col.(1990) y es conocida por PLEUROTEST y consiste en un estuche o "kit" de diagnóstico práctico y fácil, que en menos de 10 minutos nos da el resultado de si el animal tiene o no anticuerpos contra *A. pleuropneumoniae* de origen infeccioso.

Los sueros de animales infectados con *A. pleuropneumoniae* mostraron fuerte aglutinación, mientras que sueros de animales sanos o vacunados contra PCP permanecieron sin aglutinar.

1.2.6 Prevención y Control

La prevención mas adecuada de la enfermedad es evitando que entre a nuestra explotación, esto se logra teniendo un adecuado sistema de higiene y seguridad, o sea emplear un manejo de nuestra explotación óptimo.

1.2.6.1 Vacunación

Para la prevención de la PCP se han desarrollado varias vacunas con resultados diversos, tanto experimentalmente como en campo (Ciprián 1990). La

vacunación puede representar el mejor método de control desde un punto de vista económico, disminuyendo de esta forma la prevalencia de pleuritis y promoviendo animales con mejor ganancia de peso al mercado (Nielsen 1985). Muchos experimentos han demostrado que la vacunación con cepas homólogas han protegido contra la muerte y permitieron un desarrollo normal del animal.

En México Pijoan y col. en 1982 realizaron bacterinas en adyuvante de gel de hidróxido de aluminio, mostrando que inducen inmunidad humoral y celular, pero son poco eficaces para controlar la presencia lesiones pulmonares. Nielsen en Dinamarca encontró que las bacterinas en adyuvantes oleosos protegen mejor que las de adyuvantes gelificados; también confirmó que las bacterinas inactivadas no confieren protección cruzada con otros serotipos, como si sucede en forma natural.

En los experimentos que se han realizado para determinar el poder antigénico de los lipolisacáridos, cápsula, proteínas membranales y hemolisina, se ha demostrado que ninguno de ellos confiere una protección total, si no solamente una protección parcial muy similar a la que proporcionan las vacunas inactivadas comerciales.

Se han desarrollado también vacunas en base a extractos capsulares de *A. pleuropneumoniae* con adyuvante de hidróxido de Aluminio que subcutáneamente confieren buena inmunidad. Colmenares en 1990 probó la

eficiencia protectora de la inmunización con proteínas de *A. pleuropneumoniae*, utilizando 3 extractos proteicos de células completas de *A. pleuropneumoniae* y desafiando a los animales a la exposición experimental y encontró que sólo protegen contra la muerte y no contra la infección.

Pijoan (1988) realizó experimentos donde comparó las vías de administración de estas vacunas. Previamente se demostró que la combinación de *A. pleuropneumoniae* con un adyuvante oleoso producía abscesos en la zona de inoculación.

En el experimento de Pijoan (1988), se probaron las vías intraperitoneal y subcutánea. En los resultados se demostró que por la vía intraperitoneal no hubo formación de abscesos y que producía una inmunidad mucho más sólida, que permite resistir el desafío experimental. Las vacunas inactivadas y suspendidas en aceite/agua, por vía intraperitoneal, representan el medio más eficaz para prevenir la infección por *A. pleuropneumoniae*.

Se han estado haciendo trabajos para probar el uso de vacunas vivas atenuadas que pudieran estimular una protección más sólida y establecer resistencia cruzada con otros serotipos. En Minnesota Pijoan y col han estado trabajando con una cepa de baja virulencia denominada B.E.S., que se caracteriza por tener una cápsula más laxa y expresar diferentes antígenos; se ha clasificado como el subtipo 1b del serotipo 1. Esta variedad de *A. pleuropneumoniae* reduce

considerablemente la mortalidad y prevalencia de lesiones pleuríticas y existe un incremento de peso al mercado.

A. pleuropneumoniae es un microorganismo que secreta una toxina hemolítica muy parecida, si no idéntica a la Leucotoxina de *Pasteurella haemolytica* y a su vez muy similar a la hemolisina de *Escherichia coli*; quizás todas ellas de un origen común, lo que no ha sido probado aún.

La hemolisina de *A. pleuropneumoniae* es uno de sus muchos factores de virulencia, además de su cápsula, LPS, proteínas membranales y fimbrias. Se han estudiado últimamente estos factores de virulencia, no sólo su caracterización bioquímica, sino también la evaluación de su poder antigénico y su capacidad de proteger a los cerdos en el desafío experimental (*Pijoan 1988*).

El uso de bacterinas de *A. pleuropneumoniae* inactivadas se realizó al poco tiempo de haberse diagnosticado el agente causal de la enfermedad. Shope (*1964*) en sus estudios para demostrar la patogenicidad de la bacteria, realizó la inoculación de la bacteria viva por vía subcutánea y notó que no había ninguna evidencia de enfermedad y sólo en algunos casos observó la formación de induración granulomatosa en el sitio de la inyección y ganglios linfáticos regionales. Pero lo importante del experimento de Shope (*1964*), es que dos de los cerdos a los que se les aplicó una dosis de *A. pleuropneumoniae* y a otro que se le aplicaron 2 dosis al postdesafío intranasal con

A. pleuropneumoniae, junto con 3 cerdos testigos, sólo éstos murieron (Shope 1964). Desde entonces se han producido en el mundo infinidad de vacunas inactivadas que han protegido a los cerdos (Rosendal y col. 1981) y ratones (Sebunya y Saunders 1983). Pero no en todos los casos se ha logrado protección completa (Mason y col. 1982). En México (Pijoan y col. en 1978), al año siguiente de haber diagnosticado la enfermedad, produjeron una bacteria inactivada. Se demostró posteriormente que esas bacterinas en adyuvante de gel (hidróxido de Aluminio) eran muy poco eficaces y protegían sólo contra la muerte pero no contra la enfermedad.

En Dinamarca Nielsen (1985), en forma similar, demostró que las vacunas en gel no protegen contra la infección, mientras que las de adyuvante oleoso daban una mejor protección. El mismo Nielsen (1985), demuestra que no hay reacción cruzada entre los diversos serotipos. Sin embargo, los animales que se recuperan de una infección adquieren una fuerte inmunidad contra todos los serotipos.

Se han realizado últimamente trabajos que analizan los factores de virulencia de *A. pleuropneumoniae* determinando la antigenicidad y protección conferida por estos antígenos (Pijoan, 1988). Jacques y col.(1988), mediante microscopía electrónica, visualizaron el material capsular de varios serotipos de *A. pleuropneumoniae* y en todos encontraron que estaban cubiertos por una

capa de material capsular, cuyo espesor era variable para cada serotipo de *A. pleuropneumoniae*, encontrando que a mayor espesor capsular había mayor virulencia de la bacteria. También trabajaron en la caracterización de LPS de *A. pleuropneumoniae*, encontrando que puede conferir inmunidad parcial contra este microorganismo e incluso al LPS heterólogo de *E. coli* K15 también estimulaba inmunidad. Rosendal y col. (1986) estudiaron la eficacia protectora de extractos capsulares de *A. pleuropneumoniae*, indicaron que las cápsulas de *A. pleuropneumoniae* están constituidas de polisacáridos, proteínas y lipopolisacáridos (LPS). Es interesante observar que la protección conferida por el LPS purificado fue muy similar a la conferida por las vacunas inactivadas, en adyuvante de gel.

Lo anterior sugiere que el principal componente protector de dichas vacunas esta constituido por dicho antígeno.

Lázaro (1978), estudió el papel de la cápsula en la inmunidad contra *A. pleuropneumoniae*, uso mutantes no capsuladas y determinó que la cápsula es un importante factor de virulencia, que sólo confiere protección contra la muerte pero no contra las lesiones.

Estudios recientes han demostrado la presencia de proteínas restringidas por hierro en *A. pleuropneumoniae*, las cuales son antigénicas y normalmente se presentan en el exterior de la bacteria. Estas proteínas no se expresan en

bacterias cultivadas *in vitro*, ya que el hierro en el medio inhibe su síntesis, por ello se piensa que es probable que estén presentes en bacterias creciendo *in vivo* donde hay muy poco hierro accesible, (Pijoan 1988).

Quizás por esta razón las vacunas tradicionales no poseen estas proteínas y no estimulan anticuerpos contra ellas. La presencia de anticuerpos contra proteínas determina si los animales tienen anticuerpos vacunales o infecciosos. No está bien determinado el papel de las proteínas en la respuesta inmune de cerdos y si los anticuerpos contra estas proteínas son necesarios para una protección confiable de los animales (Ciprian 1993).

Rapp y Ross (1986), obtuvieron sólo una protección parcial de los animales vacunados con una suspensión purificada de proteínas membranales.

Colmenares (1990) determina que la vacunación de cerdos con fracciones proteicas de alto o bajo peso molecular no protegieron a los cerdos de la muerte al desafiarlos experimentalmente, sin embargo, cuando se vacunan con todas las fracciones proteicas del *A. pleuropneumoniae* si los protegieron contra la muerte, pero no evitó la formación de secuestros pulmonares con la bacteria en ellos.

1.2.6.2 Antibióticos.

Para el tratamiento de los animales afectados por *A. pleuropneumoniae* se han implementado el uso de diversos antibióticos y quimioterapéuticos

por diferentes vías de administración y se han obtenido resultados muy variables, pero la mayoría de las veces poco compensadores. No se puede decir que haya un antibiótico o droga que logre controlar por completo la PCP, ya que los distintos serotipos presentan una diferente susceptibilidad a las drogas e incluso hay cepas que han desarrollado una marcada resistencia a una gran cantidad de antibióticos y quimioterápicos empleados para su tratamiento. En Minnesota se reporta que el *A. pleuropneumoniae* ha demostrado mayor sensibilidad a la ampicilina, gentamicina, penicilina G y ser medianamente sensible a las tetraciclinas. Por otro lado Ciprián, en 1990 reporta que el serotipo 1 de *A. pleuropneumoniae* sólo resulto sensible a la novobiocina, Carbencilina y al Acido Nalidixico, y de ahí en fuera resistente a todos los demas antibióticos y quimioterápicos. Las Sulfas mostraron poca efectividad contra *A. pleuropneumoniae* según Mengelers (1989), y sólo mostró marcada efectividad la Sulfacloropiridazina; en cambio con las otras Sulfas se mostro una dependencia del *A. pleuropneumoniae* hacia ellas para su crecimiento.

En base a todo lo anterior algunos investigadores como Pijoan (1988), recomiendan hacer una serología estratificada para detectar el momento en que los animales son seropositivos y en base a esta edad en que se afectan, realizar una vacunación 15 días antes del supuesto brote, aunado a una medicación masiva durante esos 15 días y 15 días después de la edad en que se demostró

seropositividad. Recomienda hacer una segunda vacunación 15 días después de la primera para elevar la inmunidad en el hato. Todo esto claro está, conociendo el serotipo o serotipos presentes en cada explotación y la sensibilidad de dicho *A. pleuropneumoniae* a los antibióticos.

1.3 Virus de la enfermedad de Aujeszky:

1.3.1 Antecedentes

La enfermedad de Aujeszky se descubrió por primera vez en Hungría por Aladar Aujeszky en el año de 1902. Se encuentra ampliamente distribuida en todo el mundo. A partir de los años 70's es cuando incrementa su incidencia y esto coincide con el desarrollo porcícola mundial; siendo reportada por primera vez en México en 1975 en la zona central del país, causando graves daños a la porcicultura nacional.

1.3.2 Características de la enfermedad

La Pseudorrabia ataca a casi todas las especies de animales domésticos produciéndoles a todas ellas excepto al cerdo, un prurito intenso local y muerte en un lapso de 24 a 48 hrs. En los cerdos produce una elevada mortalidad en los lechones y es más benigna en cerdos adultos, se considera que el cerdo es el reservorio natural del virus (*Gustafson 1975, Kojnok 1965*).

Esta enfermedad es causada por un virus ADN de la familia Herpes, subfamilia alphaherpesvirinae, denominándose virus herpes porcino tipo 1 (PHV1). Es un virus generalmente muy resistente al medio ambiente, pero es altamente sensible al calor, luz ultravioleta, ebullición y a desinfectantes como los cuaternarios de amonio, ácido peracético, hidróxido de sodio y el fenol al 5% entre otros.

Como miembro de la familia Herpesviridae, es muy común su estado latente de infección en los cerdos portadores, por ello que la forma de entrada más común del virus a una granja es a través de animales de reciente adquisición para reemplazos y que se encuentran aparentemente sanos. En algunos casos la enfermedad no se manifiesta sino hasta 20 meses después (*Gustafson 1975, Bitsch y Andersen 1982*).

Los cerdos se infectan principalmente por inhalación de aerosoles con el virus o por contacto nasal entre animales sanos y enfermos. La infección por vía oral se produce al consumir alimentos o leche contaminada. También existe la transmisión durante la monta, inseminación artificial e intrauterinamente por vía transplacentaria al embrión o al feto (*Hsu y col. 1984; Iglesias 1987; Iglesias y Harkness 1988*).

La susceptibilidad a la infección depende en cierto grado de la virulencia de la cepa viral, la cantidad de virus, vía de entrada, especie animal, edad del

animal, situaciones de estrés siendo la vía más accesible la nasal, siendo los jóvenes los más afectados.

Hay excreción viral aún antes de la aparición de los signos clínicos (Mac Cullough 1988). Después de la infección, hay excreción nasal del virus durante un período de 10 días y en forma intermitente por otros 7 días. En secreciones vaginales y seminales se le encuentra después de 12 días. Se excreta también por leche durante 2 a 3 días; rara vez se le encuentra en orina y no hay reportes de hallazgos en heces, Mac Cullough (1988).

Para el establecimiento de la enfermedad de Aujeszky influye sin duda el grado de protección de cada animal; ya que los cerdos vacunados requieren de 100 a 1000 veces más virus que los cerdos no vacunados, claro que también influye el número de animales existentes, manejo e instalaciones de la granja, así también el número de animales enfermos.

El genoma del virus de la enfermedad de Aujeszky tiene la capacidad de integrarse al DNA celular y reactivarse bajo ciertas circunstancias, situación que se denomina "infección latente o latencia", y se caracteriza por la permanencia del virus o su genoma en el animal de por vida (Stevens 1971).

Esta infección puede también producirse en animales con anticuerpos calostrales o vacunales pero en menor grado (Stevens 1971).

Bajo ciertas circunstancias en este estado de latencia puede reactivarse el virus y producirse excreción del mismo.

Experimentalmente se ha logrado la reactivación del virus con la aplicación de prednisolona, dexametasona, fluctuaciones de la temperatura ambiente (de 18° - 19° C a 22° - 23° C) y aplicación intranasal de prostaglandina F2a (*Nittman y col. 1989*).

A los 4-9 días después de la inmunosupresión hay excreción viral presentando signos clínicos débiles y según Wittman (*1989*), hay un aumento en el título de anticuerpos posterior a la reactivación.

A nivel de campo se señala que el virus no se reactiva tan fácilmente (*Wright y col. 1982*).

No se ha demostrado la latencia del virus con cepas vacunales (*Wittman y Risha, 1989*).

La enfermedad en cerdos adultos presenta signos ligeros con rápida recuperación. En hembras adultas hay fiebre, anorexia, depresión y vómito. En el primer tercio de la gestación hay maceración fetal y al término puede ocurrir presencia de animales nacidos muertos.

Sin duda, lo devastador de la enfermedad se da en los animales lactantes, en los cuales puede haber una mortalidad de hasta un 100% durante las 2 primeras semanas de vida (*Pijoan y col. 1982*).

La enfermedad en el cerdo se caracteriza principalmente por signos nerviosos y lesiones en el Sistema Nervioso Central (*Olander y col 1966*); sin embargo los signos respiratorios pudieran ser la principal característica de la enfermedad (*Comer 1985, Baskerville 1971, y Baskerville y col 1971*). Se han aislado cepas atenuadas de campo capaces de producir problemas respiratorios (*Boden y col 1968*).

Hay cepas virales con una mayor afinidad por aparato respiratorio y en menor o mayor grado al Sistema Nervioso Central.

Las cerdas vacunadas, o que han sufrido la infección y se han recuperado, son capaces de transmitir anticuerpos a sus lechones, los cuales quedan protegidos contra la enfermedad, pero no contra la infección. Estos anticuerpos comienzan a declinar después de la 3er. semana quedando sin protección a la 8a. semana de vida, que es la edad en que se deben de vacunar.

1.3.3 Prevención y control

La mejor prevención en la enfermedad de Aujeszky se logra con no tenerla en la explotación, teniendo un adecuado sistema de seguridad en instalaciones, en pocas palabras llevando a cabo un programa de manejo adecuado.

1.3.3.1 Vacunación

Las vacunas contra la enfermedad de Aujeszky son de tres tipos, las inactivadas (virus muerto), las atenuadas (virus vivo), así como las obtenidas por ingeniería molecular y genética.

Vacunas inactivadas.- La protección conferida por las vacunas a virus muerto, también llamadas inactivadas, contra la enfermedad de Aujeszky que existen actualmente, varía mucho entre marcas.

En la elaboración de vacunas inactivadas intervienen numerosos factores que son críticos, en Rusia se probaron vacunas inactivadas con sulfato de cobre, etanol o formaldehído y como adyuvantes el hidróxido de aluminio o saponina. Los mejores resultados se obtuvieron con formaldehído e hidróxido de aluminio.

Las vacunas inactivadas pueden potenciar la transferencia de inmunidad materna satisfactoriamente si su calidad, método de inactivación, adyuvante y vehículo utilizado son correctos. La protección a nivel local por medio de la inmunoglobulina G en el calostro es importante y por lo tanto en los sistemas de destete precoz debe considerarse el inicio rápido de la vacunación de lechones. El calendario de vacunación es de suma importancia tanto para las crías como para los progenitores (Mc. Cullouch, 1989).

Las vacunas inactivadas pueden inducir diferentes tipos de respuestas. El estímulo de la inmunidad celular inmediata es fundamental, puesto que esta interviene en la recuperación y en la resistencia al desafío y la inmunidad humoral en la susceptibilidad inicial (*Wittmann, G.;Leitzke, I.;Hohn, V. 1985*).

Vacunas atenuadas.- Los virus atenuados se pueden obtener por pasaje en cultivo de tejidos, lo que reduce su virulencia para los cerdos y entonces es posible emplearlos como vacunas, pero este procedimiento no es siempre satisfactorio. En Alemania se desarrolló una cepa atenuada con alto poder inmunogénico que sin embargo, era patógena para lechones carentes de anticuerpos maternos, también se han atribuido brotes de pseudorrabia en bovinos al uso de vacunas a virus atenuado en cerdos de granjas vecinas a establos o lugares donde se tiene ganado bovino. Sin embargo, la administración de grandes dosis de vacuna por vía intranasal a becerros no ha resultado en la inducción de la enfermedad de Aujeszky, ni de fiebre o cualquier otro signo patológico o producción de anticuerpos neutralizantes antiherpes porcino 1 (*Oirschot y Waal, 1987*).

También se debe de considerar que no todas las vacunas atenuadas son efectivas pues esto va a variar según la cepa y las condiciones de manejo y vacunación.

La vía de aplicación de las vacunas atenuadas parece ser importante, la comparación de vacunaciones intranasal y parenteral, ha revelado que se

obtienen mejores resultados con la primera. Ya que los cerdos vacunados por la primer vía tuvieron períodos más cortos, de interrupción del crecimiento y de eliminación del virus virulento después del desafío (*Oirschot y Leeuw. 1985*)

A pesar de pequeñas discrepancias la mayoría de los investigadores coinciden en que ningún tipo de vacuna impide que el virus de campo patógeno se establezca después del desafío.

Después de una campaña de vacunación en Bélgica, en cerdos de engorda, se concluyó que la vacunación no proporcionó protección completa, ni contra la infección ni contra el desarrollo de la enfermedad clínica usando vacunas atenuadas o inactivadas, por lo que las probabilidades de erradicar la enfermedad por vacunación se consideran remotas. La vacunación, no obstante, redujo las pérdidas económicas al disminuir la severidad de la enfermedad. Las vacunas vivas, se postuló, son capaces de superar la inmunidad materna e inducir buena inmunidad, pero la principal desventaja es su dudosa seguridad.

Vacunas avirulentas.- El concepto de cepas avirulentas es un tanto nebuloso, por lo que algunos autores utilizan los términos de cepas clonadas o modificadas, pero de cualquier manera constituyen la tercera generación de vacunas, siendo las inactivadas la primera y las atenuadas la segunda.

Aunque algunos autores consideran que las vacunas atenuadas son más eficaces que las inactivadas, ninguna de ellas da protección completa contra el

desafío con un virus virulento. Los virus atenuados se obtienen por pasajes en cultivo de tejidos y por consecuencia se introducen mutantes en una forma descontrolada y la mayoría de las cepas atenuadas contienen diversas variantes. Por estas razones se recurrió a la tercera generación de vacunas. Una de ellas fue producida por la llamada ingeniería genética a partir de una cepa de campo virulenta a la cual se le quitaron o eliminaron las regiones "U" del genoma que estaban asociadas con la virulencia. Las mutantes generadas resultaron altamente inmunogénicas y vieron reducida fuertemente su virulencia (Oirschot y Leeuw. 1985).

En un experimento con la cepa Bucarest, se produjo la cepa Timidina quinasa negativa, sin la región única de virulencia, la mutante se replicó bien en cultivo de tejidos y no reversionó a virulencia *in vivo*, ni se volvió positiva, aún en medio selectivo para cepas Timidina quinasa positivas. La vacuna, aplicada por vía intramuscular, indujo formación de niveles elevados de anticuerpos y proporcionó protección contra el desafío, pero no previno la infección tonsilar persistente.

Otra cepa avirulenta Timidina quinasa negativa dió mejores resultados, pues protegió a lechones desde las 3-4 semanas contra el desafío con virus virulento; y la cepa vacunal no fué recuperada de ningún ganglio linfático de los cerdos y la cepa virulenta de desafío no fue recuperada de la mayoría de los

ganglios linfáticos de los cerdos expuestos y desafiados (*Easterday y col. 1975.*)

Recientemente, se desarrolló una vacuna por ingeniería genética, obteniendo una mutante del virus carente de los genes productores de glicoproteínas, que son los responsables de la liberación de viriones por las células, y es además Timidina quinasa negativa, esta cepa, llamada delta-Gx-delta tk, protegió a lechones contra el desafío y los animales no mostraron efectos adversos en ganancia de peso, pero no hubo reducción en la eliminación del virus virulento el desafío, resultando la cepa vacunal ligeramente virulenta para becerros, perros y gatos. La única ventaja adicional de esta vacuna fué que los animales vacunados no desarrollaron anticuerpos contra glicoproteínas (gi,gx), por lo que se puede usar la prueba de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para detectar la presencia de antiglicoproteínas y diferenciar entre cerdos vacunados e infectados naturalmente (*Wardley y Thomsen, 1988.*).

Debido a que la aplicación de vacunas a virus vivo, avirulentas o atenuadas, no ofrecen ninguna ventaja adicional real en cuanto a protección se refiere sobre las vacunas inactivadas, la tendencia actualmente en casi todo el mundo es utilizar las vacunas a virus muerto para el control de la enfermedad de Aujeszky y de ninguna manera garantiza su erradicación.

1.4 Interacción virus-bacteria en la presentación de neumonías

Existen evidencias de que hay una marcada interacción entre los agentes virales y bacterianos en la presentación de neumonías en todos los animales domésticos (*Falcon 1989*).

Los agentes primarios son aquellos que *per se* son capaces de producir enfermedad, sin la necesidad de otros factores (*Otto y Clarence, 1983*).

Hay ciertos agentes que se consideran secundarios por su incapacidad para producir por si solos un cuadro de neumonía, y por el contrario, se ha señalado que cuando hay neumonías, tanto en animales como en el hombre, el comienzo de dicho proceso tiene una etiología viral (agente primario) y los agentes que eran considerados como incapaces de producir por si solos la enfermedad, se ven ahora favorecidos por las condiciones presentes y participan activamente en la presentación y en las lesiones neumónicas. Esto tal vez se explique en base a que casi todos los agentes virales que atacan al aparato respiratorio causan una disminución de los mecanismos de defensa de dicho aparato. Sin duda, influyen las alteraciones funcionales y estructurales en el aparato mucociliar, lo que facilita la entrada, permanencia y multiplicación de agentes secundarios.

Este efecto sinérgico, es más marcado cuando los agentes involucrados son dos agentes primarios. Es decir, que el daño que cada uno de estos puede

producir separadamente en el tracto respiratorio, se ve todavía incrementado, cuando actúa conjuntamente con otro agente primario que afecte al aparato respiratorio. Tal es el caso de lo que Matthews y Pattison demostraron en 1961, cuando al inocular a cerdos intratraquealmente con virus de fiebre porcina clásica desarrollaron signos de la enfermedad con ligera lesión pulmonar y al adicionar *Haemophilus parainfluenzae* al inóculo que contenía el virus, se agravaron los signos y las lesiones del sistema respiratorio.

Un proceso similar pero con el virus de fiebre porcina clásica en combinación con *Pasteurella multocida*, fué observado por Pijoan y Ochoa en 1978, encontrando lesiones más severas a nivel pulmonar cuando se inoculaban ambos agentes en forma secuencial.

Se tienen ciertos antecedentes que sugieren que la enfermedad de Aujeszky, facilita la colonización y daño pulmonar por otros agentes como el *A. pleuropneumoniae* y son :

a) El virus se puede multiplicar en nasofaringe, tráquea y pulmón, produciendo lesiones leves en el tracto respiratorio. Beeker en 1964 reporta que hay cepas de Aujeszky neotropas asociadas a neumonías severas, y las lesiones que causa son casi indiferenciables de las causadas por la neumonía enzoótica y la influenza porcina (*Livingstone y col. 1972, Easterday 1975*).

b) La enfermedad se manifiesta en forma subclínica en los cerdos de engorda, pudiendo pasar desapercibida o cursar con alteraciones respiratorias variables, pudiéndose acompañar de leves alteraciones nerviosas (*Akkermans 1976*).

c) Las cepas pneumotropas, las atenuadas naturalmente y las vacunales se comportan en forma similar en sus marcadores de virulencia (*Bartha 1961, Badon y col. 1968, Platt 1979*).

d) En explotaciones porcinas de más de 100 vientres, donde no hay una inmunidad sólida del hato y el virus continúa circulando o por la latencia de la enfermedad o ambas situaciones, puede que existan ciclos de reinfección que causen formas clínicas leves y daños respiratorios en cerdos de engorda (*Akkermans 1970, Toma y col. 1981*).

e) El virus de la Influenza porcina y/o el virus de la Enfermedad de Aujeszky se encuentran en mayor proporción, en explotaciones de cerdos de engorda con problemas respiratorios.

Pijoan (*1988*) señala que es común encontrar brotes de PCP como resultado de que los animales se infectaron previamente con el virus de la Enfermedad de Aujeszky (VEA) que es altamente inmunosupresor.

Badiola y Pujols en 1984 demostraron en un estudio de rastro, que un alto porcentaje de pulmones con lesión, resultaron positivos al virus de Aujeszky y de estos pulmones positivos a Aujeszky un alto porcentaje también resultó

positivo al aislamiento de *Pasteurella multocida* mientras que fué mínimo en los pulmones normales.

1.4.1 Sinergia entre VEA Y *A. pleuropneumoniae*

En 1989 Falcón determinó la posible asociación de el virus de la Enfermedad de Aujeszky (VEA) en la presentación de la Pleuroneumonía Contagiosa Porcina (PCP) y para esto se realizaron dos estudios. En el primero se utilizaron 60 pulmones con lesión de PCP y 40 sin lesiones aparentes, así como la sangre acantonada en el corazón de cerdos sacrificados en el rastro. Se usaron técnicas bacteriológicas para el aislamiento de *A. pleuropneumoniae* y serológicas (ELISA) para la detección de anticuerpos contra VEA. En el segundo estudio se utilizaron 12 cerdos híbridos, recién destetados, libres de anticuerpos contra Cólera porcino, Erisipela y VEA, se vacunaron contra pseudorrabia y se distribuyeron en tres grupos de cuatro animales cada uno, se designaron al azar los siguientes tratamientos: grupo 1 testigo, grupo 2 inoculado por vía intranasal con 1800 TCID₅₀ de virus de la Enfermedad de Aujeszky cepa Shope y el grupo 3 que recibió el mismo tratamiento anterior mas una nebulización con 14 ml. de una suspensión bacteriana que contenía 2×10^4 de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 /ml., dos días después de la inoculación con el virus, se registraron los signos clínicos, se sacrificaron y se determinó el área pulmonar

afectada y se realizó bacteriología, histopatología e inmunofluorescencia de los órganos afectados. En el primer estudio se logró el aislamiento de la bacteria en 57 (95 %) de los pulmones con lesión, de los cuales 46 (76.7 %) resultaron positivos a VEA. Un pulmón con lesión en que no se logró aislar la bacteria, resultó positivo a VEA. De los pulmones sin lesión, no se obtuvo aislamiento bacteriano y 14 (35 %) de ellos resultaron positivos a VEA, encontrándose evidencia estadística ($P < 0.01$) de la asociación entre los dos agentes en la presentación de PCP. En el segundo estudio los cerdos del grupo 2 mostraron signos respiratorios leves y fiebre, se sacrificaron siete días postinoculación y a la necropsia se encontró lesión en los lóbulos pulmonares apicales y cardíacos que abarcaron el 32 % de la superficie pulmonar. Microscópicamente se encontró neumonía exudativa con edema, congestión y hemorragias se observaron corpúsculos de inclusión intranucleares y el exudado fué de células polimorfonucleares. Los cerdos del grupo 3 presentaron signos respiratorios severos, fiebre, emesis, y hemoptisis unas horas antes de la muerte, los pulmones estaban afectados en todos sus lóbulos y las lesiones se extendían en el 51 % de su superficie. Microscópicamente se encontró neumonía exudativa de células mononucleares, pleuritis, necrosis coagulativa, trombos, edema, células transformadas y corpúsculos de inclusión intranucleares. Se aisló la bacteria inoculada, de los pulmones de los cerdos del grupo 3 y se detectó la presencia del

virus en todos los pulmones de los grupos 2 y 3, la extensión de la lesión fue estadísticamente mayor ($P < 0.05$) en los pulmones de los cerdos del grupo 3. La asociación del virus con la bacteria ocasionó lesiones más severas que causaron la muerte del animal.

Este tipo de situaciones puede suceder en el campo y por consiguiente tras la vacunación contra la Enfermedad de Aujeszky se pueda presentar la Pleuroneumonía Contagiosa Porcina en forma Epizootica.

2.- OBJETIVOS.

2.1. Planteamiento del objetivo general

El objetivo principal de la tesis fue la elaboración y evaluación de un inmunógeno bivalente a base del virus de la enfermedad de Aujeszky y *Actinobacillus pleuropneumoniae*, en donde el virus de la Enfermedad de Aujeszky actúa en forma inicial en los brotes de Pleuroneumonía Contagiosa Porcina.

2.2. Objetivos particulares

2.2.1. Establecer un centro piloto de cerdos libres de patógenos específicos (S.P.F.), para contar con un suministro de cerdos con alto valor sanitario, a un costo menor y con mayor facilidad de disposición.

2.2.2. Evaluar los signos clínicos, en los diferentes grupos experimentales.

2.2.3. Evaluar las lesiones macroscópicas así como las microscópicas de los diferentes grupos de trabajo.

2.2.4. Realizar la recuperación del *Actinobacillus pleuropneumoniae* de los grupos en los que se inoculó.

2.2.5. Identificar a el virus de la enfermedad de Aujeszky a partir de los grupos en los que se vio involucrado.

2.2.6. Realizar la serología correspondiente a todos los grupos, para determinar su estado inmunológico.

3. MATERIAL Y METODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Animales

Para la elaboración de este experimento se utilizaron 20 lechones con un promedio de 30 días de edad, obtenidos del centro piloto de cerdos S.P.F. del CENID-Microbiología, los cuales fueron resultado de la cruce de 4 hembras F1 (York-Landrace) con 3 machos híbridos.

3.1.2 Instalaciones

3.1.2.1 Centro piloto de producción de cerdos S.P.F.

Para el confinamiento de los progenitores de los lechones se utilizaron parte de las instalaciones del área de Epizootiología del CENID-Microbiología, las cuales cuentan con el equipo y las normas de bioseguridad necesarias para la producción de este tipo de animales (ventanas dobles, puertas de seguridad tipo quirófano, extracción e inyección de aire automática, temperatura y humedad controlada, acceso restringido y drenaje automatizado del tipo "Flush Tank".)

En el interior de esta zona se contó con 5 zahurdas contiguas las cuales cuentan con piso de dos tipos, una porción es de concreto a la cual se le adicionó arena previamente esterilizada y en la otra porción se contó con piso de

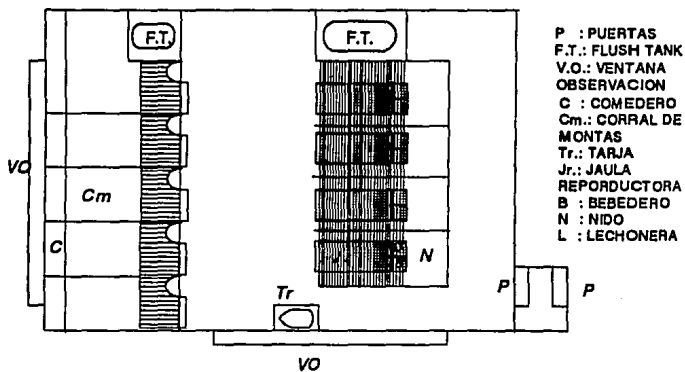
rejilla suspendida, en la zona de rejilla se encontraban los bebederos automáticos tipo cazuela, y en la zona de concreto comederos tipo canoa.

Frente a estas zaurdas, separadas por un pasillo de 90 cm. se encontraban 4 jaulas de maternidad, conformadas cada una por una zona central para la hembra con su respectivo comedero y bebedero, dos zonas laterales para lactancia y un nido con fuente térmica, todo el piso era de tipo rejilla y se contaba con un pasillo en la zona de los nidos el cual funcionaba para el chequeo de los lechones .(FIGURA#1)

3.1.2.2 Zona de aislamiento

Era parte del departamento de Epizootiología del CENID-Microbiología en la cual se ubicaron los lechones post-destete, y contaba con dos áreas una blanca y una sucia. El rea blanca constaba de un pasillo central con un cuarto de botiquín, acceso al almac,n de alimento y acceso a la entrada de los cubículos de aislamiento, la cual estaba conformada por una puerta de entrada con tapete sanitario, un lavabo con una conexión para manguera y una lámpara de luz ultravioleta. La parte donde se encontraban los lechones contaba con una ventana de doble cristal para observaciones, piso de concreto, bebedero autom tico tipo cazuela y comedero tipo tolva y dos puertas

FIGURA: 1 CENTRO PILOTO S.P.F. (C.E.N.I.D.-M.)



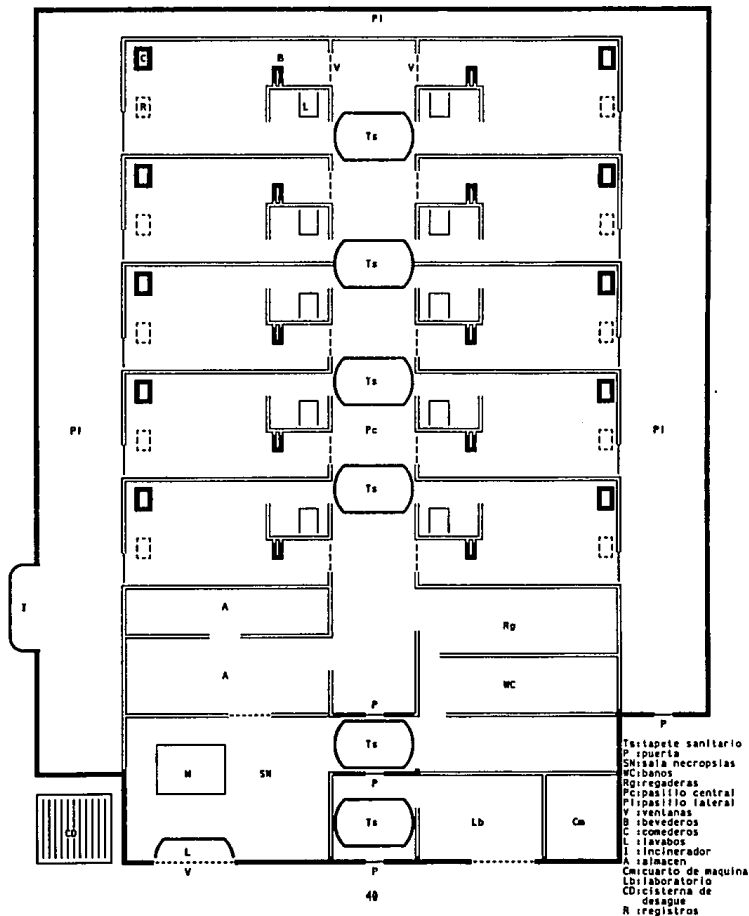
de acceso una hacia el área blanca y la otra a el área sucia. Esta última, cual estaba formada por un pasillo que circundaba a los cubículos de aislamiento y servía para el transporte de las deyecciones sólidas hacia el incinerador, el desague de los cubículos se interconectaba entre sí y se vertía en una fosa séptica a la cual se le adicionaba hidróxido de sodio como medida de bioseguridad. En esta unidad de aislamiento se encontraba una sala de necropsias la cual contaba con acceso mediante dos puertas siendo una para cada área. (FIGURA #2)

3.1.2.3 Cámara de nebulización para el desafío experimental.

Se contó con una cámara de nebulización de lámina galvanizada construida según el diseño de Sebunya y col.(1983), equipada con tres nebulizadores médicos (Devilbiss, Somerset, PA., mod.450), conectados a una compresora de aire. Esta cámara contaba con ruedas para su mas fácil movilización, sistema de aire estéril, rampa de acceso, puerta de apertura rápida y un drenaje para los líquidos de desinfección y de los mismos desechos de los cerdos.

La presión de salida del aire del compresor se reguló a 2 Kg/cm^2 , para obtener así partículas de la nebulización con un diámetro estimado de 0.5 a 5 μm . (FIGURA # 3)

FIGURA : 2 UNIDAD DE AISLAMIENTO



3.1.3 Alimento

El alimento que consumieron los animales en el centro piloto fué marca comercial Purina específico para su estado fisiológico, sin antibiótico. Los lechones consumieron desde las dos semanas de vida alimento lechoncina de la misma marca sin antibiótico.

3.1.4 Microorganismos

3.1.4.1 Virus de la enfermedad de Aujeszky

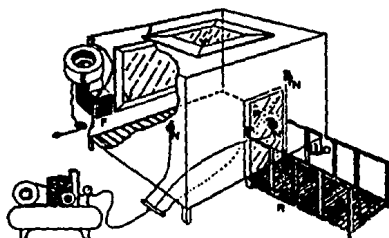
Atravéz del Departamento de Epizootiología del CENID-Microbiología se obtuvo la cepa Teoloyucan del virus de la Pseudorrabia en línea celular PK 15 que mostró un título de 10^3 en ratón, por lo que fué necesario concentrarlo con un sistema de ultrafiltración (Minitan, Millipore), determinándose posteriormente el título que fué de 10^5 . Una parte del lote de virus se utilizó como semilla vacunal. El virus de desafío se ajustó a 1800 DICT/ml.

3.1.4.2 *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Se cultivó y se obtuvo biomasa de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1. La biomasa de *A. pleuropneumoniae* se lavó tres veces en solución amortiguadora de fosfatos (PBS), y se ajustó por nefelometría a 10^8 bacterias/ml. Los cultivos se realizarón en medio BHI suplementado con extracto fresco de levadura al 10 %.

3.2 Métodos

FIGURA 3



Vista isométrica de la cámara de nebulización diseñada para el desafío experimental de los cerdos. P. puerta; R. rampa de acceso; V. ventana; F. filtro; E. extractor; N. nebulizador; D. drenaje.

3.2.1 Preparación de los inmunógenos

3.2.1.1 Obtención del virus

La cepa Teoloyucan del virus de la enfermedad de Aujeszky, cultivada en línea celular PK15 se utilizó como semilla vacunal y virus de desafío. El cultivo de la cepa viral tuvo un título de 10^3 en ratón por lo que fue necesario concentrar por medio de un sistema de ultrafiltración (Minitan, Millipore.), posteriormente se determinó el título que fue de 10^5 . De este lote se utilizó una parte como semilla vacunal inactivándose con β -propiolactona. También se utilizó una parte de éste cultivo ajustándose a 1800 DICT/ml. como virus de desafío.

3.2.1.2 Elaboración de la cepa bacteriana

Se cultivo y se obtuvo biomasa de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1. La biomasa de *A. pleuropneumoniae* se lavo tres veces con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) y se ajusto por nefelometría a 10^8 bacterias/ml. Los cultivos se realizaron en medio BHI suplementado con extracto fresco de levadura al 10 %. Este cultivo se utilizó como semilla de desafío y vacunal a la que posteriormente se le inactivó con formaldehído y se le adicionó el adyuvante de hidróxido de aluminio.

3.2.1.3 Elaboración del inmunógeno bivalente

Consistió en combinar la semilla del virus de la Pseudorrabia con título en ratón de 10^5 /ml. con *Actinobacillus pleuropneumoniae* con un título de 10^8 /ml. en el adyuvante, envasándose al final en viales estériles.

3.2.1.4 Control de calidad

Se evaluó mediante la siembra de los inmunógenos en medios de cultivo en condiciones aeróbicas y anaeróbicas e inoculándolos a ratones y manteniéndolos en observación por un período de 15 días, cumpliendo así con las normas del "Code of Federal Regulations del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América".

3.2.2 Diseño experimental

Se formaron cinco grupos experimentales a partir de 2 camadas de 10 lechones SPF, destetados a los 30 días de edad promedio, obtenidos del centro piloto del CENID-Microbiología. Cada grupo experimental constió de 4 lechones y se confinó cada uno de ellos en un cubículo de la unidad de aislamiento. Se les dió un período de adaptación de siete días antes de iniciar el experimento.

Los grupos quedaron de la siguiente manera :

Grupo 1) ,ste fue vacunado con el virus de la enfermedad de Aujeszky y desafiado con el mismo.

Grupo 2) los animales de est, grupo fueron vacunados contra *A. pleuropneumoniae* y desafiados contra *A. pleuropneumoniae*.

Grupo 3) vacunados contra el virus de la enfermedad de Aujeszky, desafiados contra el mismo y *A. pleuropneumoniae*.

Grupo 4) sin vacunar y desafiados contra *A. pleuropneumoniae*.

Grupo 5) vacunados con el virus de la Enfermedad de Aujeszky y *A. pleuropneumoniae* y desafiados con los mismos.

3.2.3 Vacunación de los diferentes grupos con VEA y App.

Grupo 1) Se vacunó contra el virus de la Enfermedad de Aujeszky el día 1 del experimento con 2 ml/intraperitoneal por animal.

Grupo 2) Se vacunó contra *Actinobacillus pleuropneumoniae* el día 1 del experimento con 2 ml./intraperitoneales por animal.

Grupo 3) Se vacunó contra el virus de la Enfermedad de Aujeszky el día 1 del experimento con 2 ml/intraperitoneal por animal.

Grupo 4) Se vacunó con 2 ml. solución salina fisiológica el día 1 del experimento por vía intraperitoneal.

Grupo 5) Se vacunó contra el Virus de la Enfermedad de Aujeszky y con *Actinobacillus pleuropneumoniae* el día 1 del experimento utilizando el inmunógeno bivalente a estudiar, con una dosis de 2 ml/intraperitoneal por animal.

3.2.4 Desafío con el virus de la Enfermedad de Aujeszky.

Los grupos uno, tres y cinco se desafiaron el día 10 del experimento con 1800 DICT por vía intranasal (2 ml.)

3.2.5 Desafío con el *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Los grupos dos, tres, cuatro y cinco se desafiaron con *Actinobacillus pleuropneumoniae* por nebulización de 3×10^8 bacterias /ml. en un total de 14 ml. en 30 minutos y esto se realizó el día 14 del experimento. (CUADRO # 1)

3.2.6 Sacrificio y necropsia.

Los cerdos de los cinco grupos se sacrificaron el día 30 del experimento (16 días postdesafío con App.), utilizando Azaperona (2mg/kg p.v. I.M.) para sedación y Clorhidrato de metomidato (1.5mg/kg p.v. I.V.) para su anestesia, posteriormente se realizó la exsanguinación de todos los animales y se procedió a realizar la necropsia de rutina.

3.3 Evaluación de las lesiones macroscópicas

3.3.1 Evaluación de lesiones pulmonares por planimetría.

Todos los pulmones fueron removidos y las áreas de lesión pulmonar fueron evaluadas bajo el sistema descrito por Ciprián (1988).

3.4 Toma de muestras

3.4.1 Histopatología

Durante la necropsia se tomaron muestras de aproximadamente 1 cm^3 de cerebro y pulmón, y fueron fijadas en formalina amortiguada al 10 %, se incluyeron

Cuadro 1 DIAGRAMA DEL EXPERIMENTO

DIA DEL EXPERIMENTO	1	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
GRUPO I YAC, VEA DES, VEA	V A C	V E A				A P P																	S A C R I F I C I O
GRUPO II YAC, A _{pp} - DES, A _{pp} -	V A C					A P P																	
GRUPO III YAC, VEA DES, VEA Y A _{pp} -	V A C	V E A				A P P																	
GRUPO IV NO YAC, DES, A _{pp} -						A P P																	
GRUPO V YAC, VEA Y A _{pp} - DES, VEA Y A _{pp} -	V A C	V E A				A P P																	
DIA DE SANGRADO	S	S				S		S				S											S

en parafina y se hicieron cortes en un microtomo de 6 micrómetros de espesor, posteriormente se tineron con hematoxilina eosina para su observación.

3.4.2 Recuperación del agente

3.4.2.1 Recuperación e identificación del App.

Se realizaron siembras de pulmón, corazón, riñón, hígado y bazo en medio BHI agar adicionado con 5 % de globulos rojos, posteriormente se les aplicó la cepa nodriza de *Staphylococcus aureus* y se procedieron a incubar en condiciones adecuadas. Las colonias que mostraron satelitismo se reaislaron y se procedió a evaluarlas con antisueros de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en sus diferentes serotipos.

3.4.2.2 Identificación del virus de la pseudorrabia

El virus se identificó por la técnica de anticuerpos fluorescentes según Falcón (1989), realizandose a los siguientes órganos: pulmón, corazón, riñón, hígado, bazo y encefalo.

Prueba de anticuerpos fluorescentes.

Esta prueba determina la presencia de antígenos del virus de la enfermedad de Aujeszky, mediante el empleo de anticuerpos específicos teñidos con isotiocianato de fluoresceina. Su procedimiento a grandes rasgos es el siguiente:

A un corte de la muestra del órgano a evaluar se le adiciona el anticuerpo específico, el cual se encuentra tenido con el isotiocianato de fluoresceína, se incuban y se lava, para eliminar el anticuerpo que no se unió al antígeno y se procede a observarse en el microscopio de fluorescencia, donde si la muestra es positiva a la enfermedad sospechada, se observara la unión del antígeno anticuerpo mediante la fluorescencia del anticuerpo específico.

3.5 Obtención de sueros

3.5.1 fechas de sangrado en los grupos experimentales.

Las fechas de sangrado en los cinco grupos experimentales fueron las siguientes:

1er. sangrado	día 1
2o. sangrado	día 10
3er. sangrado	día 14
4o. sangrado	día 16
5o. sangrado	día 20
6o. sangrado	día 30

De las muestras sanguíneas obtenidas se procedió a centrifugarlas y obtener los sueros que sirvieron para las pruebas serológicas correspondientes.

3.6 Pruebas serológicas

3.6.1 Prueba de Pleurotest.

Esta prueba fue diseñada por el Ciprián y col.(1992), es una aglutinación en placa, de realización sencilla, rápida y económica, que sirve para identificar a los animales que se encuentran infectados por App. de los que están vacunados o son libres de esta enfermedad y su procedimiento es el siguiente :

Se estabilizan los sueros junto con el antígeno de la prueba a temperatura ambiente por un corto periodo de tiempo, posteriormente se colocan las muestras de suero en los pozos de la placa del pleurotest y se les adiciona el antígeno correspondiente al serotipo que se busca, se homogeniza con el palillo mezclador y se procede a realizar una evaluación cualitativa, en donde los sueros de los animales infectados junto con el antígeno específico se aglutinarán dando la apariencia de grumos, mientras que los sueros de los animales vacunados o libres de la enfermedad permanecerán sin cambio. La prueba se corrió para los serotipos 1, 2, 3, 5, 7 y 9, a todos los grupos.

4. RESULTADOS

4.1 Instalaciones

4.1.1 Centro piloto de producción de cerdos S.P.F.

Los apareamientos, gestación y parto se efectuaron sin problema alguno. De esta manera quedo instalado este centro piloto para la producción de lechones de alta calidad sanitaria (S.P.F.).

4.1.2 Unidad de aislamiento

En esta unidad se encontraron los siguientes problemas : inadecuado funcionamiento de bebederos, mal sistema de iluminación, y deficiente control en la temperatura ambiental. Solo pudiendo corregir el funcionamiento de los bebederos y el sistema de iluminación, quedando pendiente el control de la temperatura ambiental.

4.2 Animales

El pie de cría base fueron 5 hembras blancas tipo Yorkshire - Landrance (F1) y 3 machos, que en su período de adaptación no presentaron problemas sanitarios, exceptuando una hembra que en este período presentó signos de inapetencia, debilidad, hipotermia, postración, palidez de las mucosas y piel, murió a los 4 días del inicio de los signos. Se le practicó la necropsia la cual

reveló la presencia de una úlcera gástrica de aproximadamente 6 cm. de diámetro, causante de su muerte, atribuyéndose su origen al estrés causado durante el transporte de su lugar de origen al CEND-Microbiología.

El resto de los animales transcurrieron su periodo de adaptación sin ningún problema. Se presentan a continuación los promedios de 7 días de frecuencia cardíaca, temperatura y frecuencia respiratoria:

SEMENTAL A) 38.4° C	108.5 F.R.	30.4 F.C.
SEMENTAL B) 38.5° C	113.1 F.R.	31.6 F.C.
SEMENTAL C) 38.6° C	108.1 F.R.	33.5 F.C.

HEMBRA A) 38.5 C	109.4 F.R.	33.3 F.C.
HEMBRA B) 38.4 C	106.1 F.R.	30.0 F.C.
HEMBRA C) 38.5 C	103.4 F.R.	32.4 F.C.
HEMBRA D) 38.4 C	101.5 F.R.	28.9 F.C.
HEMBRA E) 39.1 C	105.6 F.R.	37.3 F.C.

4.2.1 Parámetros reproductivos de las hembras del centro piloto

HEMBRA A) 12 lechones, 10 vivos, 2 muertos, 7 machos y 5 hembras, los fallecidos eran machos.

HEMBRA B) 10 lechones vivos, 6 machos y 4 hembras.

HEMBRA C) 13 lechones, 9 vivos, 5 machos y 4 hembras, los fallecidos eran 2 hembras y 2 machos.

HEMBRA D) 10 lechones vivos, 6 hembras y 4 machos.

Es pertinente señalar que los decesos en los lechones fueron al nacer, desconociéndose la causa de ello.

En total se obtuvieron 39 lechones vivos, los cuales fueron destetados y enviados a el área de aislamiento del CENID-Microbiología, con un promedio de 30 días de edad, tomándoseles muestras sanguíneas. A éstas se les realizó un estudio serológico contra Fiebre Porcina Clásica, Enfermedad de Aujeszky, Paramixovirus Porcino y Pleuroneumonía Contagiosa Porcina, resultando en todos los casos negativos, corroborando de esta manera que eran animales libres de patógenos específicos.

4.3 Inmunógenos

4.3.1 Control de calidad de la vacuna

El control de calidad de las vacunas, consistió en determinar la pureza, mediante la siembra en medios de cultivo y la inocuidad en animales de laboratorio. Siendo ésta satisfactoria según las normas establecidas por el "Code of Federal Regulations", del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América.

4.4 Signos clínicos posvacunación

Grupo 1: en éste grupo los lechones vacunados contra la Enfermedad de Aujeszky, presentaron anorexia, postración, ligera disnea y elevación en su temperatura corporal.

Grupo 2: en éste grupo de animales vacunados contra *A. pleuropneumoniae* los animales presentaron elevación en su temperatura corporal, disnea, anorexia y postración.

Grupo 3: animales sólo vacunados contra el virus de la Enfermedad de Aujeszky: mostraron postración, aumento de la temperatura corporal, anorexia y ligera disnea.

Grupo 4: éstos animales no fueron vacunados pero se les administró solución salina fisiológica para ser sometidos al mismo estres que los demás animales y no presentaron signos clínicos aparentes posinoculación con solución salina fisiológica.

Grupo 5: éste fue el grupo donde se evaluó la vacuna bivalente. Los animales posvacunación sólo mostraron ligera disnea, anorexia y un aumento ligero de su temperatura corporal.

4.5 Signos clínicos posdesafío

4.5.1 Signos clínicos observados posdesafío en los diferentes grupos:

Grupo 1: los signos clínicos en este grupo fueron disnea, postración, anorexia y elevación de la temperatura corporal de alrededor de los 40° a 41° C.

Grupo 2: los animales de este grupo presentaron una marcada anorexia, disnea y postración.

Grupo 3: en este bloque de animales un sólo individuo mostró signos de disnea a los 5 días.

Grupo 4: en este grupo se presentaron signos de tipo neumónico como son: disnea, postración, anorexia y aumento en su temperatura corporal.

Grupo 5: en los cerdos de este grupo la hipertermia, anorexia y postración fueron mas leves los de los grupos 1 y 2 .

4.5.2 Registro de la temperatura corporal

4.5.2.1 Registro de temperaturas corporales promedio de los grupos.

Grupo 1: los cerdos de este grupo mostraron una hipertermia considerable que se inicio alrededor del día 11 al 18, posteriormente descendió hasta alcanzar niveles normales alrededor del día 26, y el día 27 se mostró una ligera hipotermia. (Figura 4)

Grupo 2: se mostró un incremento en su temperatura corporal por arriba de lo normal del día 14 al 16, posteriormente deciendo a niveles normales para despues volver a incrementarse el día 17 manteniendo esta hipertermia hasta el día

21, a partir de este decae hasta mostrar una ligera hipotermia que dura hasta el día 23 y se normaliza. (Figura 4)

Grupo 3: en este grupo no se demuestran cambios significativos causados por el desafío por el virus de la enfermedad de Aujeszky. El día 14 que fue cuando se desafío con *A. pleuropneumoniae* se observa un pico de hipertermia hasta el día 16 retomando niveles normales, hacia el día 23 se observa un ligero descenso en su temperatura corporal.(Figura 5)

Grupo 4: hacia el día 14 se incrementó la temperatura corporal con índices superiores al promedio normal, para decender a niveles normales el día 18, el día 25 se muestra una ligera hipotermia que se mantiene formando picos hasta el día 30.(Figura 5)

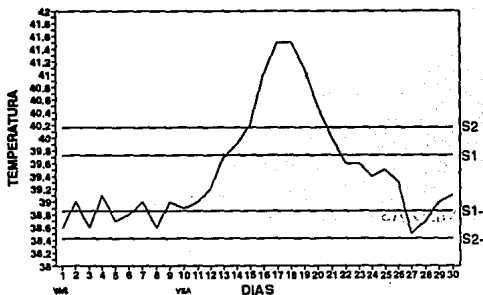
Grupo 5: este es el grupo donde se evaluó el inmunógeno bivalente y hacia el día 10 se denota un ligero aumento en la temperatura , posteriormente el día 15 se marca otro aumento y se denota una ligerísima baja de temperatura hacia el día 27.(Figura 6)

4.6 Evaluación en los animales sacrificados.

4.6.1 Lesiones macroscópicas

Como resultado de la necropsia realizada a los animales de los diferentes grupos se encontró:

GRUPO1
VACUNADO VEA DESAFIADO VEA



GRUPO 2
VACUNADO App.

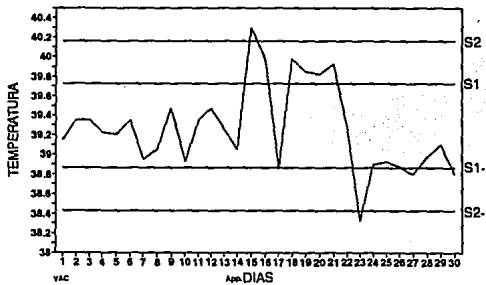
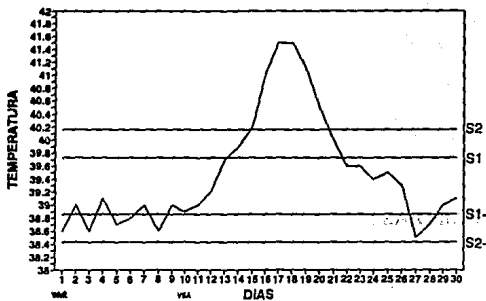


Figura 4: MEDIAS DE TEMPERATURA DE LOS GRUPOS 1 Y 2.

En la figura 4-1, se observa un pico de hipotermia a partir del día 11, con un máximo los días 17 y 18. En la figura 4-2, se observan dos picos de hipotermia, el primero con una máxima el día 15 y el segundo del día 18 al 21. La hipotermia observada en los dos grupos en los últimos días se debió al ayuno.

GRUPO 1
VACUNADO VEA DESAFIADO VEA



GRUPO 2
VACUNADO App.

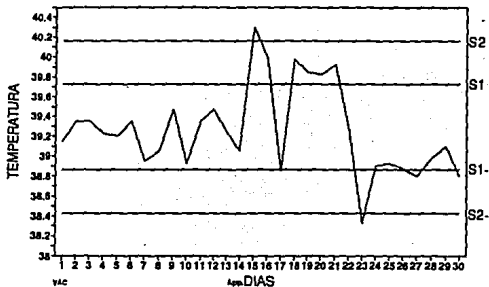
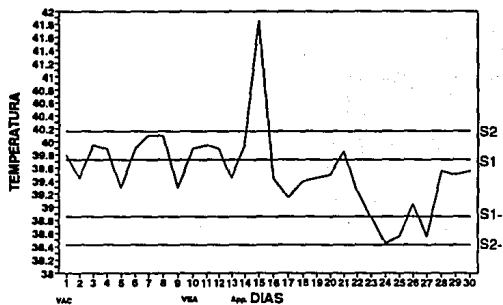


Figura 5: MEDIAS DE TEMPERATURA DE LOS GRUPOS 3 Y 4.

En la figura 5-3, solamente se observa un pico de hipertermia hacia el día 16. En la figura 5-4, se observa un incremento en la temperatura corporal hacia el día 14, volviendo a su normalidad el día 18. La hipertermia observada en los últimos días del experimento se debió al ayuno.

GRUPO 3
VACUNADO VEA DESAFIADO VEA App



GRUPO 4
NO VACUNADO DESAFIADO App.

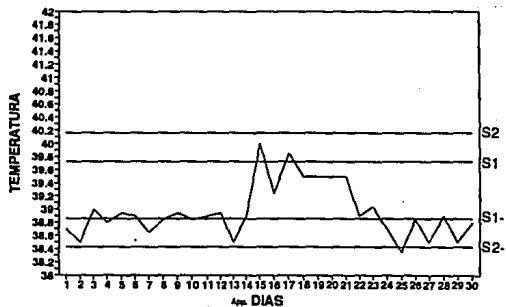
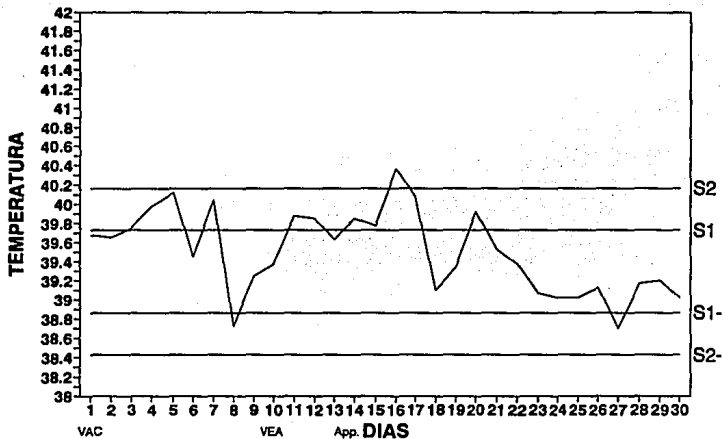


Figura 6: MEDIAS DE TEMPERATURA DEL GRUPO 5,

En la figura 6-5, se observa un ligero aumento en la temperatura el día 10, de igual manera se denota otro pequeño pico de hipotermia el día 15, para volver a su normalidad el día 18. La hipotermia observada en los últimos días del experimento se debió al ayuno.

GRUPO 5
VACUNA VEA BACTERINA App.



- No existió lesión en el sitio de inoculación de los inmunógenos empleados en ningún animal de los diferentes grupos.

- A excepción de el aparato respiratorio, los demás órganos se hallaron como sin cambios patológicos aparentes (S.C.P.A.).

4.6.2 Lesiones macroscópicas pulmonares por grupo. (Cuadro 2)

Grupo 1: este grupo que fue vacunado con el Virus de la Enfermedad de Aujeszky y desafiado con el mismo, no se encontraron lesiones pulmonares macroscópicas. (Figura 7)

Grupo 2: los animales de este grupo que fueron vacunados contra *A. pleuropneumoniae* y desafiados contra *A. pleuropneumoniae*, se encontraron lesiones que abarcaron el 8% de la superficie pulmonar, eran fibrinohemorrágicas de tipo agudo, con adherencias pleurales. En tres de los animales se encontraron lesiones de tipo crónico. Las lesiones se encontraron en los diferentes lóbulos pulmonares, con una mayor afección de los diafragmáticos. (Figura 8)

Grupo 3: vacunados contra el Virus de la Enfermedad de Aujeszky, desafiados contra el mismo y *A. pleuropneumoniae* presentaron áreas de lesiones pulmonares fibrinohemorrágicas con adherencias que variaron del 25 al 30% de la superficie pulmonar. La mayoría de las lesiones fueron del tipo

pleuroneumónico crónico y se distribuyeron por todos los lóbulos pulmonares, principalmente en los diafragmáticos. (Figura 9)

Grupo 4: sin vacunar y desafiados contra *A. pleuropneumoniae*, los cerdos de este grupo presentaron lesiones pleuropneumónicas de tipo crónico de menor tamaño comparándolas con las del grupo 3 y sólo en uno de los animales fue de tipo agudo. Las lesiones abarcaron cerca del 17% de la superficie pulmonar y con una distribución similar a los grupos anteriores. (Figura 10)

Grupo 5: vacunados contra el Virus de la Enfermedad de Aujeszky y *A. pleuropneumoniae* y desafiados con los mismos, de éste sólo 2 animales presentaron lesiones con un área de consolidación de aproximadamente 7%, uno era fibrinohemorrágico agudo y el otro de tipo crónico, ambos con adherencias y las lesiones se ubicaron principalmente en los lóbulos apicales y cardíacos. El resto de los animales no demostró cambios patológicos aparentes. (Figura 11)

4.6.2 Lesiones microscópicas por grupo. (Cuadro 3)

Grupo 1: en este grupo de las muestras procesadas solo en pulmón se encontraron lesiones aparentes, que fueron congestión e infiltración perivascular.

Grupo 2: por lo que respecta a este grupo, en dos de los cuatro animales se encontraron macrófagos transformados clásicos de pleuroneumonía contagiosa porcina, lesión vascular aguda y en tres de ellos formaciones granulomatosas.

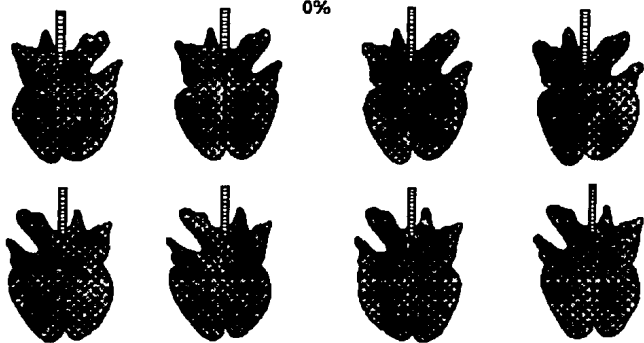
CUADRO 2

LESIONES MACROSCOPICAS

GRUPO	TRATAMIENTO	LESIONES MACROSCOPICAS	% DE LESION PULMONAR
I	VACUNADOS V.E.A. DESAFIADOS V.E.A. 15 DIAS POSVACUACION	S.C.P.A	---
II	VACUNADOS App. DESAFIADOS App. 14 DIAS POSVACUACION	EN 3 DE LOS 4 ANIMALES SE ENCONTRARON LESIONES DE TIPO AGUDO FIBRINO HEMORRAGICAS CON ADHERENCIAS PLEURALES	8 %
III	VACUNADOS V.E.A. DESAFIADOS V.E.A. Y App. A LOS 10 Y 14 DIAS POSVACUACION	EN TODOS LOS ANIMALES PRESENTARON LESIONES FIBRINOHEMORRAGICAS CON ADHERENCIAS PLEURALES TIPO PLEURONEUMONICO CRONICO	25 %
IV	SIN VACUNAR DESAFIADOS CON App. 14 DIAS POSVACUACION	UN ANIMAL CON LESIONES DE TIPO AGUDO, Y DOS PRESENTARON CONSOLIDACION Y ADHERENCIAS	17 %
V	VACUNADOS V.E.A. Y App. DESAFIADOS V.E.A. Y App. 10 Y 14 DIAS POSVACUACION	SOLO 2 ANIMALES PRESENTARON LESIONES, UNO DE TIPO FIBRINOHEMORRAGICO AGUDO Y EL OTRO DE TIPO CRONICO CON ADHERENCIAS	7%

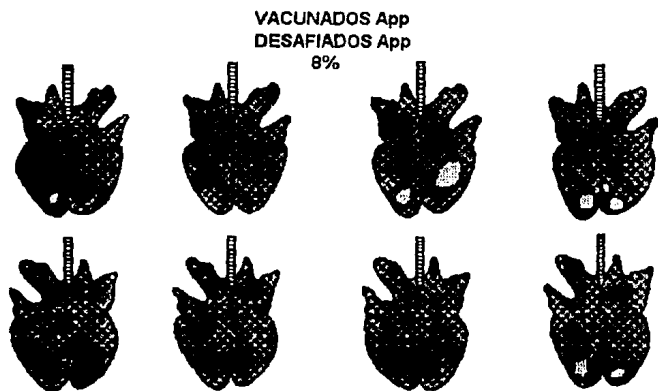
FIGURA 7

VACUNADO VEA
DESAFIADO VEA
0%



Distribución y aspecto de las lesiones macroscópicas en los pulmones de los cerdos después del desafío experimental con el virus de la Enfermedad de Aujeszky, en los animales del grupo 1 (vacunado contra VEA).

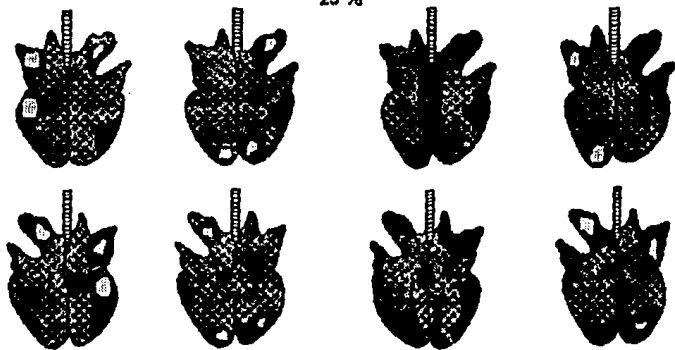
FIGURA 8



Distribución y aspecto de las lesiones macroscópicas en los pulmones de los cerdos después del desafío experimental con *A. pleuropneumoniae* , en los animales del grupo 2 (vacunados contra *A. pleuropneumoniae*)

FIGURA 9

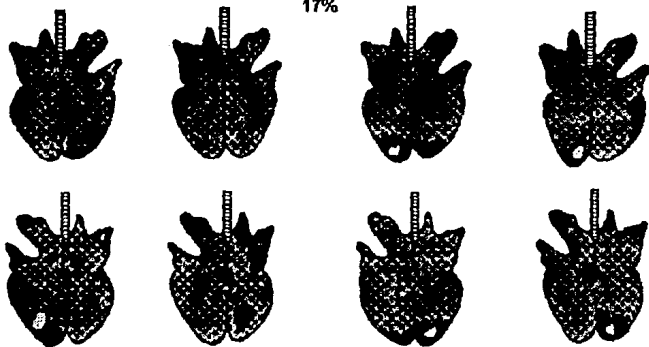
VACUNADO VEA
DESAFIADO VEA Y App.
25 %



Distribución y aspecto de las lesiones macroscópicas en los pulmones de los cerdos, después del desafío experimental con el virus de la Enfermedad de Aujeszky y *A. pleuropneumoniae*, en los animales del grupo 3 (vacunados con VEA).

FIGURA 10

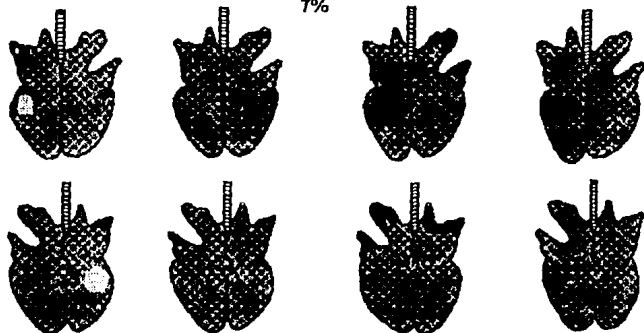
SIN VACUNA
DESAFIADO App.
17%



Distribución y aspecto de las lesiones macroscópicas en los pulmones de los cerdos, después del desafío experimental con *A. pleuropneumoniae*, en los animales del grupo 4 (sin vacunar).

FIGURA 11

VACUNADO VEA, App.
DESAFIADO VEA, App.
7%



Distribución y aspecto de las lesiones macroscópicas en los pulmones de los cerdos, después del desafío experimental con el virus de la Enfermedad de Aujeszky y *A. pleuropneumoniae*, en los animales del grupo 5 (vacunados con el inmunógeno bivalente).

Grupo 3: se encontró que en tres animales de éste existían macrófagos transformados clásicos de pleuroneumonía contagiosa porcina y en uno de ellos lesión vascular aguda.

Grupo 4: en este grupo se encontró que todas las muestras presentaron macrófagos transformados clásicos de pleuroneumonía contagiosa porcina, en tres de ellas se halló proliferación de tejido linfoide y en uno lesión vascular aguda.

Grupo 5: una de las cuatro muestras presentó granulomas, otra más presentó macrófagos transformados clásicos de pleuroneumonía contagiosa porcina y dos de ellas no presentaron cambios patológicos aparentes.

4.7 Recuperación e identificación de los agentes inoculados.

4.7.1 Identificación del Virus de la Enfermedad de Aujeszky.

La identificación del VEA se realizó mediante una prueba de inmunofluorescencia en órganos y tejidos encontrándose los siguientes resultados:

En el grupo 1, todos los pulmones fueron positivos a la inmunofluorescencia, mientras que el corazón, hígado, bazo y encefalo resultaron negativos.

CUADRO 3
LESIONES MICROSCOPICAS

GRUPO	TRATAMIENTO	ORGANO	LESIONES HISTOPATOLÓGICAS
I	VACUNADO V.E.A. DESAFIADOS V.E.A. 10 DIAS POSVACUNACION	PULMON	SOLO EN UN PULMON DE ESTE GRUPO SE ENCONTRÓ CONGESTION E INFILTRACION PERIVASCULAR
II	VACUNADOS App. DESAFIADOS App. 14 DIAS POSVACUNACION	PULMON	EN DOS DE LOS CUATRO PULMONES SE ENCONTRARON MACROFAGOS TRANSFORMADOS. LESION VASCULAR AGUDA, Y EN TRES HUBO FORMACIONES GRANULOMATOSAS
III	VACUNADOS V.E.A. DESAFIADOS V.E.A. Y App. A LOS 10 Y 14 DIAS POSVACUNACION	PULMON	EN TODOS LOS PULMONES SE ENCONTRARON LESIONES, 3 DE ELLOS PRESENTARON MACROFAGOS TRANSFORMADOS CLASICOS Y EL OTRO PRESENTO LESION VASCULAR AGUDA
IV	SIN VACUNAR DESAFIADOS CON App. A LOS 14 DIAS POSVACUNACION	PULMON	TODAS LAS MUESTRAS PRESENTARON MACROFAGOS TRANSFORMADOS CLASICOS, EN TRES DE ELLAS SE ENCONTRÓ PROLIFERACION DE TEJIDO LINFOIDE Y EN UNA LESION VASCULAR AGUDA
V	VACUNADOS V.E.A. Y App. DESAFIADOS V.E.A Y App. 10 Y 14 DIAS POSVACUNACION	PULMON	UNA DE LAS MUESTRAS PRESENTO GRANULOMAS, OTRA MAS PRESENTO MACROFAGOS TRANSFORMADOS CLASICOS Y LAS 2 RESTANTES FUERON S.C.P.A.

Grupo 2, todas las muestras analizadas resultaron negativas a la inmunofluorescencia.

Grupo 3, los pulmones de este grupo salieron positivos en los cuatro animales, mientras que los demás órganos fueron negativos.

Grupo 4, todos los órganos de este grupo resultaron negativos a la inmunofluorescencia.

Grupo 5, solamente los pulmones de este grupo resultaron positivos a la prueba de inmunofluorescencia. (Cuadro 4)

4.7.2 Aislamiento e identificación de *A. pleuropneumoniae*.

Grupo 1: en este grupo de muestras no se aisló ninguna colonia sospechosa de *A. pleuropneumoniae*.

Grupo 2: en uno de los cuatro animales fue posible aislar una colonia sospechosa e identificarla como *A. pleuropneumoniae*.

Grupo 3: en este grupo se aisló e identificó a el *A. pleuropneumoniae* en las cuatro muestras procesadas.

Grupo 4: aquí se pudo aislar e identificar a el microorganismo inoculado en dos de las cuatro muestras.

Grupo 5: solo una de las cuatro muestras correspondientes a este grupo fue hallada como positiva a el aislamiento e identificación del microorganismo. (Cuadro 5)

4.8 Serología

4.8.1 Prueba de Pleurotest.

La prueba de Pleurotest fue corrida en todos los grupos experimentales, con el suero obtenido por los sangrados a diferentes fechas del experimento y se encontró lo siguiente:

GRUPO	1er.	2o.	3er.	4o.	5o.	6o.	SEROTIPO
1	-	-	-	-	-	-	1
2	-	-	-	+	+	+	1
3	-	-	-	+	+	+	1
4	-	-	-	+	+	+	1
5	-	-	-	+	+	+	1

El pleurotest se corrió para los serotipos 1, 2, 3, 5, 7 y 9, resultando solamente positivos el grupo 2, 3, 4 y 5 al serotipo 1 posdesafío.

CUADRO 4: Identificación del virus de la Enfermedad de Aujeszky, por anticuerpos fluorescentes

ORGANO	GRUPO *				
	I	II	III	IV	V
PULMON	positivo (4/4)	negativo	positivo (4/4)	negativo	positivo (4/4)
CORAZON	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
RINON	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
HIGADO	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
BAZO	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
ENCEFALO	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo

* cuatro cerdos por grupo

CUADRO 5: recuperacion de A. pleuropneumoniae
a partir de los organos, de los cerdos desafiados

ORGANO	GRUPO *				
	I	II	III	IV	V
PULMON	negativo	positivo (1/4)	positivo (4/4)	positivo (2/4)	positivo (1/4)
CORAZON	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
RINON	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
HIGADO	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
BAZO	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo

* cuatro cerdos por grupo

4.- DISCUSION

En las instalaciones del C.E.N.I.D.- MICROBIOLOGIA se obtuvo la primera producción de cerdos S.P.F. de la República Mexicana, la cual se realizó bajo las condiciones de bioseguridad y manejo necesarias para lograr el objetivo con éxito en la obtención de lechones libres de patógenos específicos. Los lechones aquí obtenidos fueron animales idóneos para la prueba, evaluación y desarrollo de los diferentes biológicos, debido a que su sistema inmunológico no se encontró sensibilizado a ciertos agentes, por lo cual se puede evaluar la respuesta inmunológica de dichos animales hacia el biológico en prueba en forma individualizada, sin tener que tomar en cuenta la respuesta inmune a otros agentes que normalmente se encuentran en los cerdos convencionales.

Al pie de cría, para su buen desarrollo, se le dio el manejo nutricional, reproductivo y sanitario normal.

Los resultados encontrados en estos animales bajo las condiciones de bioseguridad implantadas fueron capaces de desarrollar parámetros reproductivos normales.

Los lechones obtenidos del pie de cría mantuvieron la calidad sanitaria de sus progenitores, meta que se cumplió según lo revelaron las pruebas serológicas realizadas.

Al realizar la evaluación de signos posvacunales se encontró que :

En el grupo 1 y 3 vacunados contra la enfermedad de Aujeszky, la anorexia, postración, ligera disnea y elevación de la temperatura corporal que demostraron los animales, se interpretó como debido a la reacción de la vacunación y al estrés al que fueron sometidos.

En el grupo 2 vacunado contra *Actinobacillus pleuropneumoniae*, la anorexia, postración, ligera disnea y elevación de la temperatura corporal que demostraron los animales, se atribuyó a la reacción de la vacunación y al estrés al que fueron sometidos.

En el grupo 4 al que se le administró solución salina fisiológica, los animales no demostraron signos clínicos aparentes, como se esperaba.

En el grupo 5 vacunados contra la Enfermedad de Aujeszky y *Actinobacillus pleuropneumoniae*, la ligera disnea, anorexia y leve incremento en la temperatura corporal se interpretarán como reacciones normales a la vacunación y estrés recibido.

En lo que respecta a los signos clínicos posdesafío se determinó lo siguiente :

En el grupo 1 la anorexia, postración, ligera disnea y elevación de la temperatura corporal entre 40° y 41° C. se debe a una reacción por el desafío

contra la Enfermedad de Aujeszky como lo encontró de igual forma Falcón (1987 a).

En el grupo 2 la marcada anorexia, disnea y postración se debieron a que la vacunación solo previene la muerte, pero no la colonización temporal del pulmón y por consiguiente se dan signos de enfermedad. (Falcón 1987 a)

En el grupo 3 solo un animal presentó marcados signos respiratorios a los 5 días posdesafío, en los demás animales no se demostraron signos clínicos aparentes, pero esto no significa que no se encontraran con lesiones.

En el grupo 4 los signos de tipo neumónico encontrados se debieron al desafío con *Actinobacillus pleuropneumoniae*, no causando la muerte de los animales por que se utilizaron dosis subletales de las cepas de desafío. (Falcón 1989)

En el grupo 5 los signos clínicos aparentes fueron mucho mas leves que los del grupo 1 y 2, debiéndose esto a la protección conferida probablemente por el inmunógeno bivalente.

Los incrementos en la temperatura corporal observados del día 11 al 18 en el grupo 1 se debieron a la reacción causada por el desafío con el VEA. La hipotermia causada sobre el día 26 y 27 se debió a causas ajenas y debido principalmente a la falta de alimento. (Manual Merck 1983)

La hipertermia encontrada en el grupo 3 del día 14 al 16 se debió a la reacción producida por el desafío con *A. pleuropneumoniae*, regresando a niveles normales, posteriormente se elevó en forma moderada del día 17 al 21, después se encontró una hipotermia que dura hasta el día 23 y se normaliza, esto se debió a causas ajenas y debido principalmente a la falta de alimento. (*Manual Merck 1983*)

La hipertermia presentada en el grupo 4 se debió a el desafío contra *A. pleuropneumoniae* y a la falta de protección contra esta enfermedad, esta hipertermia se presentó del día 14 al 18, y posteriormente se marcó como picos de elevación de la temperatura corporal debidos posiblemente a la reacción del organismo hacia la infección bacteriana, sin haberse presentado la muerte por ser desafiados con dosis subletales, y la hipotermia mostrada del día 25 al día 30 se debió a causas ajenas y principalmente a la falta de alimento. (*Manual Merck 1983*)

El día 10 se presentó una ligera hipertermia debida a la reacción de la vacunación en el grupo 5, posteriormente el día 15 se marca una hipertermia cercana a los 40.5° C. debida a la reacción del organismo a el desafío, la presentación de ligera hipotermia hacia el día 27 se debió a causas ajenas y principalmente a la falta de alimento. (*Manual Merck 1983*)

En todos los grupos de experimentación el único órgano con lesiones macroscópicas fue el pulmón, lo cual coincide lo encontrado por

Falcón(1989 B), quien reporta solamente daño pulmonar en los animales vacunados y desafiados contra la Enfermedad de Aujeszky.

Con lo que respecta a las lesiones macroscópicas encontradas en los diferentes grupos mostraron:

En el caso del grupo 1 vacunado contra la Enfermedad de Aujeszky y desafiado con el mismo, no se encontraron lesiones pulmonares macroscópicas, no coincidiendo de esta manera a lo encontrado por Falcón y col. (1987 B).

Los animales del grupo 2, vacunados con *Actinobacillus pleuropneumoniae* y desafiados con el mismo, presentaron un 8% de superficie pulmonar lesionada, de tipo fibrinohemorrágica con adherencias pleurales, lesiones esperadas como lo reporta Falcón(1989). Las lesiones de tipo crónico encontradas en 3 de los animales nos dan la referencia de un proceso en el cual la vacunación se encuentra protegiendo de la muerte al animal pero no de la colonización y afección del tracto respiratorio.

En el grupo 3 existió de un 25 a 30% de lesión pulmonar, esto fue de esperarse debido a que se encontraban vacunados contra la Enfermedad de Aujeszky y desafiados contra la misma y contra *Actinobacillus pleuropneumoniae*, la mayoría de las lesiones fueron de tipo pleuroneumónico crónico, corroborando de esta forma lo encontrado por Falcón (1987 b).

Es importante observar que en los animales del grupo 4 que fueron sin vacunar y desafiados con *Actinobacillus pleuropneumoniae* presentaron solamente un 17% de superficie pulmonar lesionada, siendo este porcentaje menor que el presentado por los animales del grupo 3, comprobándose una vez más que la vacunación contra la Enfermedad de Aujeszky exacerba los brotes de pleuroneumonía contagiosa porcina como lo demostró Falcón(1987 b).

En cuanto a los animales del grupo 5 que fueron vacunados contra la Enfermedad de Aujeszky y *Actinobacillus pleuropneumoniae* y desafiados con los mismos, el porcentaje de lesión pulmonar fue de tan solo el 7% , por lo que pensamos que nuestro inmunógeno bivalente proporcione mayor protección hacia los animales, que en los grupos en que solo se inmunizó contra un solo agente.

En lo que respecta a las lesiones microscópicas, en el grupo 1 solo se encontraron lesiones de tipo congestivas e infiltrado perivascular, las cuales pudieron ser causadas por ser animales vacunados contra la Enfermedad de Aujeszky y desafiados contra la misma.

En dos de los animales del grupo 2 se encontraron conglomerados de macrófagos transformados clásicos de infecciones por *Actinobacillus pleuropneumoniae* como lo reporta Falcón(1989), así como lesión vascular aguda, y en tres de los cuatro animales se encontraron infartos y formaciones granulomatosas, esto se debió a que la vacunación contra *A. pleuropneumoniae*

solo protege contra la muerte de los animales, pero no evita la colonización y la formación de lesiones en pulmón por parte de la bacteria como lo demostró Falcón(1989).

Tres de los cuatro animales del grupo 3 presentaron macrófagos transformados y lesión vascular aguda, así como lesiones de tipo crónico, esto es acorde a lo encontrado por Falcón(1987 B), estos animales se encontraban vacunados contra la Enfermedad de Aujeszky y desafiados contra la misma y contra *A. pleuropneumoniae*, motivo por el cual se exacerbó la presentación de la pleuroneumonía contagiosa porcina (Falcón, 1989).

En los animales del grupo 4 que no fueron vacunados y desafiados con *A. pleuropneumoniae* la presencia de macrófagos transformados clásicos, proliferación de tejido linfóide y lesión vascular aguda se explica por la acción del *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Pijoan 1982).

Grupo 5 vacunados contra la Enfermedad de Aujeszky y *Actinobacillus pleuropneumoniae* y desafiados contra los mismos, se encontro que solo un animal presento conglomerados de macrófagos transformados, en otro se encontraron formaciones granulomatosas y en los dos animales restantes no se encontraron cambios patológicos aparentes, esto nos confirma que el grado y tipo de lesión es menor que en los grupo 3 y 4.

En cuanto a la identificación del VEA la prueba de inmunofluorescencia reveló que en los grupos 1, 3, y 5 se identificó la presencia del virus en pulmón solamente, resultando negativos los demás órganos, debiéndose esto a que el virus colonizo el tracto respiratorio a pesar de que los animales se encontraban inmunizados contra el virus de la Enfermedad de Aujeszky; este fenómeno era de esperarse ya que la vacunación no protege de la replicación viral en el pulmón, de hecho ninguna vacuna de la Enfermedad de Aujeszky, aún las de ingeniería genética protege del daño pulmonar (Ciprián, 1993).

En cuanto al grupo 1, el aislamiento de App. como era de esperarse no se aisló pues este grupo no se desafió con *A. pleuropneumoniae*; en cambio el grupo 2 vacunado contra *A. pleuropneumoniae* y desafiado contra *A. pleuropneumoniae*. Solo en uno de los cuatro animales se aisló *A. pleuropneumoniae* esto se debió a que ningún inmunógeno actual evita la colonización del pulmón por parte del *A. pleuropneumoniae* solamente son capaces de prevenir la muerte, ya que las vacunas empleadas hasta el día de hoy solamente contienen Antígeno capsular, y hoy en día se sabe que los mecanismos de patogenicidad importantes en *A. pleuropneumoniae* son sus citotoxinas (Rycroft y Col.1991). El grupo 3 en este se encontró que todas las muestras presentaron la formación de colonias positivas a *A. pleuropneumoniae*

esto se debió a que estaban vacunados contra VEA y desafiados contra la misma y contra App, y se demuestra claramente la interacción existente entre el Virus de la Enfermedad de Aujeszky y el *A. pleuropneumoniae* (Falcón, 1989.). Por su parte en el grupo 4 se encontraron 2 casos positivos a *A. pleuropneumoniae* y fue el grupo que no se encontraba vacunado y solo se desafió contra *A. pleuropneumoniae* esto se debió posiblemente a que se utilizaron dosis bajas de *A. pleuropneumoniae*. En el grupo 5 se encontró que solamente una muestra de las cuatro fue positiva a *A. pleuropneumoniae*, así como resulto ser positivo a la prueba inmunológica del Pleurotest post-desafío, y solamente haber presentado un 7% de lesión pulmonar, en dos de sus cuatro animales y solamente una de estos presentó microscópicamente granulomas, todo esto se debió a que el inmunógeno brindo una protección adecuada hacia el desafío con los dos agentes etiológicos mencionados, demostrando de nueva manera la interacción existente entre la vacunación contra la Enfermedad de Aujeszky y la presentación abrupta y severa de la Pleuroneumonía Contagiosa Porcina.

Por lo que respecta a la prueba de Pleurotest se encontró que los grupos 2, 3, 4 y 5 resultaron positivos a su evaluación serológica posdesafío hacia el serotipo 1, siendo negativos a los serotipos 2, 3, 4, 5, 7 y 9.

6.- CONCLUSIONES

1.- Por lo que respecta a lo realizado en el Centro Piloto de cerdos S.P.F., determinamos que es factible la producción de este tipo de animales con alto nivel sanitario con las condiciones existentes en nuestro País.

2.- Encontramos que los animales vacunados con el Virus de la Enfermedad de Aujeszky son protegidos contra la muerte, pero no se evita la colonización y el daño del tejido pulmonar.

3.- Determinamos que los animales vacunados contra la Enfermedad de Aujeszky y desafiados contra la misma y contra *A. pleuropneumoniae* se ven afectados de mayor manera que los no vacunados contra la Enfermedad de Aujeszky.

4.- Se encontró que los animales vacunados contra App. y desafiados contra el mismo, no morían, pero presentaban signos y lesiones típicas de pleuroneumonía.

5.- Los animales no vacunados contra App. y desafiados contra el mismo, presentaron lesiones y signos neumónicos, pero fue en menor grado que aquellos que fueron vacunados contra VEA y desafiados con VEA y App, demostrándose la existencia clara de un sinergismo entre el VEA y el *A. pleuropneumoniae*.

6.- Se encontró que los animales vacunados en forma bivalente y desafiados con los dos agentes etiológicos presentaron mucho menor grado de lesión y signos neumónicos que los demás grupos.

7.- Determinamos que el inmunógeno bivalente funciona, y que es pertinente realizarle una prueba de campo para determinar su factibilidad de producción a mayor escala.

7. BIBLIOGRAFIA

Akkermans, J.P.W.M.: Serum prophylaxis in Aujeszky's disease in pigs. Neth. J. Vet. Sci., 3:12-17 (1970).

Akkermans, J.P.W.M.: Aujeszky's disease. Ann. Med. Vet., 120:295-306 (1976).

Aladar, 1902, Citado en : Wittman, G., Risha, H.J.: Aujeszky's disease (pseudorabies) in pigs. In Herpesvirus disease of cattle, horses and pigs. Edited by G. Wittman, Klumer Academic Publishers, pp. 230 (1989).

Badiola, S.J.I. y Pujols, R.J. : Estudios sobre la interacción del virus de Aujeszky con *Pasteurella multocida* en los procesos neumónicos del cerdo. Tesis de maestría, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan. U.N.A.M., Cuautitlan Izcalli (1984).

Bartha, A.: Attempts at attenuating the virulence of Aujeszky's disease virus. Magy. Allatory. Lap. 16:42-45 (1961).

Baskerville, A.: The histopathology of experimental pneumonia in pigs produced by Aujeszky's disease virus. Res. Vet. Sci. 14:223-228 (1973).

Baskerville, A.: Ultrastructural changes in the lungs of pigs infected with Aujeszky's disease virus. Res. Vet. Sci. 14:229-233 (1973).

Becker, C.H.: Zur bedeutung der lunge fur die pathologisch anatomische diagnose der Aujeszky'schen Kraukheit des scweines. Monatshefte. Vet. Med. 19:5-11 (1964).

Bitsch, V., Andersen, J.B.: On the epidemiology of Aujeszky's disease in Denmark and the possibilities of its control Aujeszky's disease. G. Wittman, S.A., Hall (Eds.) Luxerbourg (1982).

Boden, L., Meszaros, J., Papp-Vid, G. and Romuary, J.: Properties of Aujeszky's disease virus strains isolated from swine pneumonia cases. Acta. Vet. Acad. Sci. Hung. 18:107-109 (1968).

Ciprián, C.A., Colmenares, V.G. y Mendoza, E.S. : La enfermedad en México *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Compendio sobre *Actinobacillus*

(*Haemophilus pleuropneumoniae*. Ed. Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. pp.29-40 (1990).

Ciprián, C.A., Colmenares,V.G., Mendoza,E.S.: *Actinobacillus pleuropneumoniae*. La enfermedad en México II. Sint. Porc. Vol 9, No.5, Mayo:40-46 (1990).

Ciprián, C.A., Comunicación personal (1993).

Colmenares,V.G.: Evaluación de la inmunidad conferida por extractos proteicos de *Haemophilus pleuropneumoniae* mediante desafío experimental. Tesis de maestría. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan. U.N.A.M., Cuautitlan Izcalli, Edo. de México. (1990).

Corner, A.H.: Pathology of experimental Aujeszky's disease in piglets. Res. Vet. Sci. 6:337-343 (1965).

Easterday, B.C.: Swinen influenza in :Diseases of swine. Edited by Dunne, H.W & Leman, A.D. pp 141-167 Iowa State Univ. Press., Iowa (1975).

Falcon, N.A. : Efecto del virus de la Enfermedad de Aujeszky (Pseudo-Rabia) sobre la presentación de la pleuroneumonía contagiosa porcina. Tesis de maestría. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan. U.N.A.M. Cuautitlan Izcalli. (1989).

Falcon, N.A., De Paz, V.O., Morales, J., Batalla, C.D., Alvarado, A., Mendoza, S., Hernandez, B.E., Camacho, J., Ciprián, C.A : Sinergia entre el virus de la Pseudorrabia (PRV) y *Haemophilus pleuropneumoniae* 1.- Infección secuencial y evolución de los signos clínicos. II Congreso ALVEC, XXII Convención AMVEC, III Encuentro UNPC. pp 175. Acapulco, Guerrero, México (1989).

Falcon, N.A., De Paz, V.O., Morales, J., Batalla, C.D., Sierra, N., Tortora, P.J., Mendoza, S., Hernandez, B.E., Camacho, J., Ciprián, C.A.: Sinergia entre el virus de la Pseudorrabia (PRV) y *Haemophilus pleuropneumoniae*. II.- Tipo de lesiones macro-microscópicas y agentes involucrados en la neumonía. II Congreso ALVEC, XXII Convención AMVEC, III Encuentro UNPC. pp 176. Acapulco, Guerrero, México (1989).

Flores, M., J.A. y Agraz., A.A. : Ganado porcino. Cría, explotación, enfermedades e industrialización. 2a. Edición. Ed. Limusa, México, D.F. (1979).

Gunnarsson, A., E.L. Biberstein. & B. Hurvell.: Serologic studies on porcine strains of *Haemophilus parahaemolyticus* (*pleuropneumoniae*): agglutination reactions. Am. J. Vet. Res. 38:1111-1114 (1977).

Gustafson, D.P. : Pseudorabies. In: disease of swine. H.W. Dunne., A.D. Leman (Eds.), 4th. pp. 391-410. Iowa State Univ. Press., Iowa (1975).

Hsu, F.S., Liu, T.H., Chung, W.B. : Aislamiento del virus de la Pseudorabia del semen del tracto reproductivo de verracos adultos. Procc Int. Pig. Vet. Soc. Congress. Gent, Belgica, pp 27 (1984).

Icaza, G.R. : Frecuencia de decomisos por determinadas enfermedades en los rastros de la periferia del D.F. en el periodo comprendido entre 1987 y 1989, Tesis licenciatura, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, U.N.A.M. México, D.F. (1989).

Iglesias, G. : Estudios sobre los métodos de transmisión del virus de la Enfermedad de Aujeszky. Med. Vet. 4(2):81-84 (1987).

Iglesias, G., Harkness, J.W. : Studies of transplacental & perinatal infection with two clones of a single Aujeszky's disease (pseudorabies) virus isolate. Vet. Mic. 16:243-254 (1988).

Jacques, M., Foiry, B., Higgins, R. y Mitall, K.R. : Electron microscopic examination of capsular material from various serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. J. Bacteriol. 170:No. 7: 3314-3318 (1988).

Kojnok, J. : The role of carrier sows in the spreading of Aujeszky's virus carriership among fattening pigs. Acta. Vet. Hung. 15:281-295 (1965).

Lazary, S., Scholl, E., Rivera, E. : Immune response to *Haemophilus paraahaemolyticus* (HP) infection in the pig in vitro test to detect sensitized cells in the blood of infected and vaccinated animals. Vet. Microbiol. 3:143-154 (1978).

Livingston, C.W., Stair, E.L., Underdahl, N.R. & Mebus, C.A. : Pathogenesis of Mycoplasmal pneumonia in swine. Am. J. Vet. Res. 33:2249-2258 (1972).

Martinez, N.I., Restrepo, F.I. y Zamora, M.E. : Alimentación básica y desarrollo agroindustrial. 1a. Ed. Fondo de Cultura Económica. México, D.F. (1989).

Mason, R.W., McKay, R.W. y Carbould, A. : Field testing of a killed *Haemophilus paraahaemolyticus* vaccine in pigs. Aust. Vet. J. 58:108-110 (1982).

Matthews, P.R.J. & Pattison, I.H. : The identification of a *Haemophilus* like organism associated with pneumonia and pleuresy in the pig. J. Com. Path. 71:44-52 (1961).

Mc. Cullouch, S.J. : Vaccination and control of Aujeszky's disease in North Ireland. Vaccination and control of Aujeszky's disease. Ed. J.T. Van Oirschot, Kluger Academic Publishers. pp. 231-238 (1989).

Mengellers, M.J.B., Klingerren, V.B., Miert, V.A.S.J.P.A.M. : In vitro antimicrobial activity of sulfonamides against some porcine pathogens. Am. J. Vet. Res. 50:No.7:1022-1028 (1989).

Mytrea, P.J., Fraser, G., Mc. Queen, P., Lambourn, D.A. : Pleuropneumonia in pigs caused by *Haemophilus parahaemolyticus*. Aust. Vet. J. 50:255-259 (1974).

Necoechea, R.R. : Enfermedad y su relación con el medio ambiente, en : Diagnostico de las enfermedades del cerdo. Ed. R.R. Necoechea y C. Pijoan. México, D.F., pp. 155-176 (1982).

Nielsen, R. : *Haemophilus parahaemolyticus* as the cause of pleuropneumonia in swine. I.- Clinical, pathological and epidemiological studies. Nosl. Vet. Med. 22:246-255 (1970).

Nielsen, R., and P.J., O'conor. : Serological characterization of 8 *Haemophilus pleuropneumoniae* strains and proposal of a new serotype : serotype 8. Acta. Vet. Scand. 25:96-106 (1984).

Nielsen, R. : Serological characterization of *Haemophilus (Actinobacillus pleuropneumoniae)* strains and proposal of a new serotype: serotype 9. Acta. Vet. Scand. 26: 501-512 (1985).

Oirschot, J.T. Van., Leeuw, P.W. de, : Intranasal vaccination of pigs against Aujeszky's disease. 4. Comparison with one or two doses of an inactivated vaccine in pigs with moderate maternal antibody titres. *Veterinary Microbiology*. 10(5): 401-408 (1985).

Oirschot, J.T. Van, Waal, C.A.H. de, : An ELISA to distinguish between Aujeszky's disease vaccinated and infected pigs. *Vet. Rec.* 121:305-306 (1987).

Otto, H.S., Clarence, M.F. *El manual Merck de veterinaria*. 2a. edición. Merck and Company, Inc., Rattway, N.J. U.S.A. (1983).

Pijoan, C., y Ochoa, G. : *Resúmenes de la Reunión Bianual de Microbiología*, Toluca, México. (1978).

Pijoan, C., Ochoa, G. y Gordon, M.R. : *Resúmenes de la XIV Reunión Anual de AMVEC*, Los Mochis, Sinaloa. (1978).

Pijoan, A. C. : Pleuroneumonía. En : *Diagnóstico de las enfermedades del cerdo*. Ed. R.R. Necochea y C. Pijoan. México, D.F. pp.527-531 (1982).

Pijoan, A. C., Ramírez, N. R. : Enfermedades de los cerdos. 1a. Edición corregida y aumentada, Ed. Diana. México, D.F. (1987).

Pijoan, A. C. : Clínica Porcina 87/88., Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, U.N.A.M., México, D.F. (1988).

Pinheiro, M. L.C. : Los cerdos, 1a. Edición en español, Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina (1973).

Platt, K.B., Mare, C.J. and Hinz, P. N. : Differentiation of vaccine strains and field isolates of Pseudorabies virus : Thermal sensitivity and rabbit virulence markers. Arch. Virology. 60:12-23 (1979).

Pohl, S., Bertschinger, H.V., Frederiksen, W. and Mannheim, W. : Transfer of *Haemophilus pleuropneumoniae* and the *Pasteurella haemolytica* - organism causing porcine necrotic pleuropneumonia to the genus *Actinobacillus* (*Actinobacillus pleuropneumoniae* comb.nov.) on the basis of phenotypic and deoxyribonucleic acid relatedness. Int. J. Syst. Bact. 33:510-514 (1983).

Ramírez, N. R. : Congreso Nacional de Medicina Veterinaria, Centro Médico Nacional, noviembre (1976).

Rapp, U.J. y Ross, R.F. : Antibody response of swine to outer membrane components of *Haemophilus pleuropneumoniae* during infection. *Infect. Immun.* 54:No.3 : 751-760 (1986).

Rosendal, S., Carpenter, D.S., Mitchell, W.R. y Wilson, M.R. : Vaccination against pleuropneumonia in pigs caused by *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Can. Vet. J.* 22:34-35 (1985).

Rosendal, S., y D. A. Boyd. *Haemophilus pleuropneumoniae* serotyping. *J. Clin. Microbiol.* 16:840-843 (1982).

Rosendal, S., Miniats, O.P., Sinclair, P.: Protective efficacy of capsule extracts of *Haemophilus pleuropneumoniae* in pigs and mice. *Vet. Microbiol.* 12:229-240 (1986).

Rycroft, A.N., Williams, D., Cullen, J. M., Macdonald, J. : The citotoxin of *Actinobacillus pleuropneumoniae* (pleurotoxin) is distinct from the haemolysin

and is associated with a 120 kDa polypeptide. J. of General Microbiology. 137:3:561-568 (1991).

Salinas, B. H. : La inspección Sanitaria de Carnes bajo régimen federal en México. Su descripción y crítica. Tesis Licenciatura. Escuela Nacional de Medicina Veterinaria y Zootecnia. U.N.A.M., México, D.F. (1960).

Sebunya, T. N. K. and Saunders, J. R. : *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in swine. J. Am. Vet. Ass. 182:1331-1337 (1983).

Shope, R. E. : Porcine contagious pleuropneumonia I: Experimental transmission, etiology and pathology. J. Exp. Med. 119:357-368 (1964).

Stevens, J. G. : Latent Herpes simplex virus inspinal ganglia of mice. Science. 173:843-845 (1971).

Toma, B., Ursache, R., Rose, R., Lorant, J. M., Metianu, T., Vigoroux, A., Duce, J., Prave, M. and David, C. : Aujeszky's disease in France in 1980. Rec. Med. Vet. 157:515-518 (1981).

Wardley, R.C., Berlinsky, P. J. and Thomsen, D.R. : A bioengineered pseudorabies virus vaccines. The effect of vaccination on latency and reactivation of wild type virus. Proceeding International Pig Veterinary Society Congress 1988, Brasil. 179. International Pig Veterinary Society Congress 1988, Brasil (1988).

Wittmann, G., Leitzke, L., Hohn, V. : Cell-mediated cytotoxicity and lymphocyte stimulation in Aujeszky's disease. I.- Experimentally infected swine. Zentralblatt für Veterinärmedizin 32(2):101-115 (1985).

Wittmann, G., Risha, H. J. : Aujeszky's disease (pseudorabies) in pigs. In Herpes virus Disease of cattle, horses and pigs. Edited by G. Wittmann, Kluwer Academic. Publishers, pp, 230 (1989).

Wright, J. C., Thawly, D.G. and Solorzano, R. R. : Field evaluation of test and removal vaccination as control measure for pseudorabies in Missouri swine. Can. J. Comp. Med. 46:420-425 (1982).