

11661 2  
2j



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

ELABORACION Y EVALUACION DE UNA VACUNA  
INACTIVADA PARA PREVENIR LA ENFERMEDAD  
DEL OJO AZUL (EOA) DE LOS CERDOS

**T E S I S**  
QUE PRESENTA  
**ATALO CANDIDO MARTINEZ LARA**  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRO EN CIENCIAS**  
**(AREA: MICROBIOLOGIA)**

ASESOR:

PABLO CORREA GIRON, M.V.Z., M.A.

COASESORES:

JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO, M.V.Z., M. Sc., PhD.

ELISEO HERNANDEZ BAUMGARTEN, M.V.Z., M. Sc., PhD.



CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1996

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

H. JURADO PARA LA REVISIÓN DE LA PRESENTE TESIS Y PARA EL EXAMEN DE GRADO.

PRESIDENTE: DR. ELISEO HERNANDEZ BAUMGARTEN

VOCAL: DR. PABLO CORREA GIRON

SECRETARIO: DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO

PRIMER SUPLENTE: DR. ALVARO AGUILAR SETIEN

SEGUNDO SUPLENTE: DR. SUSANA ELISA MENDOZA ELVIRA

LOS TRABAJOS DE LA PRESENTE TESIS DE MAESTRIA, SE REALIZARON EN LAS INSTALACIONES DEL LABORATORIO DE VIROLOGIA, PROYECTO PARAMIXOVIRUS PORCINO, DEL CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES DISCIPLINARIAS EN MICROBIOLOGIA (CENID-M), DEL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES Y AGROPECUARIAS (INIFAP), DE LA SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA Y DESARROLLO RURAL (SAGAR), EN PALO ALTO, D.F., MEXICO.

## **FINANCIAMIENTO**

**ESTE TRABAJO FUE FINANCIADO CON RECURSOS DEL PROYECTO PARAMIXOVIRUS PORCINO DEL CENID-M, INIFAP, SAGAR Y PARCIALMENTE CON SEMOVIENTES DEL PIEPEME, A. C.**

**DEDICATORIA**

**A MI FAMILIA : ALICIA Y, DULCE MARIA E ISAIAS.**

**A MIS PADRES : PAULA Y ENCARNACION (FINADO).**

**A MIS HERMANOS : ERCILA, GUILLERMO, PEDRO, GABRIEL, LUZ MARIA Y AGUSTIN.**

**A MIS DEMAS FAMILIARES Y AMIGOS QUE ME HAN BRINDADO SU VERDADERA AMISTAD.**

DEDICATORIA

A MI FAMILIA : ALICIA Y. DULCE MARIA E ISAIAS.

A MIS PADRES : PAULA Y ENCARNACION (FINADO).

A MIS HERMANOS : ERCILA, GUILLERMO, PEDRO, GABRIEL, LUZ MARIA Y AGUSTIN.

A MIS DEMAS FAMILIARES Y AMIGOS QUE ME HAN BRINDADO SU VERDADERA AMISTAD.

## AGRADECIMIENTOS

El autor expresa su agradecimiento a:

- CENID-M, INIFAP, SAGAR, por su apoyo durante los estudios de Maestría y para la realización de la presente tesis.
- PAIEPEME A.C. por haber financiado parcialmente estos experimentos.
- Al CONACYT, por la beca otorgada durante los estudios de la Maestría.
- A la Coordinación General de Estudios de Posgrado de la FESC-UNAM.
- A las autoridades del INIFAP.
- Al Dr. Pablo Correa Girón por sus valiosas enseñanzas, paciencia y asesoría en la realización de la presente tesis.
- A la MVZ, María Antonia Coba Ayala por su importante apoyo en la presente tesis.
- A la QBA, Rocio Pallares Cuevas por el apoyo brindado en la presente tesis.
- A mis coasesores de Tesis: Dr. Juan Antonio Montaraz Crespo y Dr. Eliseo Hernández Baumgarten, por sus valiosas enseñanzas y ayuda.
- Al Dr. Abel Ciprián C. y a la Dra. Susana Mendoza E. por su ayuda.
- Al MVZ, PhD., José Cuarón I. y al MVZ, MC, José A. Rentería F., por habernos facilitado las cerdas en la etapa de gestación adecuada.
- Al Dr. Esteban Labradero I. por su valiosa intervención y apoyo en la adquisición de una parte de los semovientes empleados en esta tesis y también por su siempre oportuna ayuda.
- Al QFB, MC, Germán Colmenares V. por habernos facilitado su cámara para inoculación por aerosoles.



- A los C. Martín Cruz S., Esteban García G. y a todo el personal del Proyecto Paramixovirus porcino por su ayuda.

- Al Ing. José Luis Rincón V. por su siempre oportuno apoyo.

- Así como al personal del CENID-M y a todas aquellas personas que de alguna manera me brindaron su ayuda.

## INDICE

	Página
Capítulo I	1
Resumen general	1
Introducción General	3
Literatura citada	26
Hipotesis y objetivo general	37
Capítulo II.-Evaluación en lechones de la inocuidad y antigenicidad de una vacuna inactivada oleosa contra la Enfermedad del Ojo Azul	38
2.1 Resumen	39
2.2 Introducción	40
2.3 Objetivos particulares	41
2.4 Material y métodos	42
2.5 Resultados	47
2.6 Discusión	49
2.7 Conclusiones	52
2.8 Literatura citada	57
Capítulo III.- Determinación de la dosis del PMVP/LPM que mata al 80%-100 % de lechones susceptibles	63
3.1 Resumen	64
3.2 Introducción	65
3.3 Objetivos	66
3.4 Material y métodos	67
3.5 Resultados	72
3.6 Discusión	75
3.7 Conclusiones	76
3.8 Literatura citada	80
Capítulo IV. Protección pasiva conferida a lechones de cerdas vacunadas, con una vacuna inactivada contra la enfermedad del ojo azul	83
4.1 Resumen	83
4.2 Introducción	86
4.3 Objetivo particular	87
4.4 Material y métodos	88
4.5 Resultados	92

	Página
4.6 Discusión	97
4.7 Conclusiones	101
4.8 Literatura citada	116
Conclusiones generales	121

## RESUMEN GENERAL

Con el objeto de desarrollar y evaluar una vacuna inactivada oleosa contra la Enfermedad del Ojo Azul (EOA) de los cerdos, ocasionada por el Paramyxovirus Porcino (PMVP), se hicieron 3 experimentos.

En un primer experimento, la antigenicidad e inocuidad de la vacuna contra la EOA, inactivada con irradiación gamma, se evaluó en 5 lechones lactantes. Cada lechón se vacunó, por vía intramuscular (IM) en los jamones, con 3 dosis de 4 ml cada una, a los 16, 26 y 37 días de edad; dos lechones testigos recibieron la misma dosis de placebo. Veintiocho días después de la última aplicación del inóculo respectivo, todos fueron desafiados con  $10^4$  Dosis Infectantes para Cultivos Celulares (DICC)<sub>50%</sub>/ml del PMVP de La Piedad, Michoacán (LPM), por vía IM. Durante 140 días, a todos se les dió un seguimiento clínico y serológico. En el segundo experimento, con el objeto de contar con una "cepa" de desafío adecuada, se determinó la dosis del PMVP capaz de matar al 80 % de los lechones susceptibles. Para ello, se inocularon dentro de una cámara de aerosoles 2 grupos de 5 lechones cada uno, de 4 y 7 días de edad con dos dosis diferentes del PMVP/LPM; los grupos A y B recibieron 28 ml X  $10^7$  DICC<sub>50%</sub>/35 min y 28 ml X  $10^8$  DICC<sub>50%</sub>/42 min, respectivamente; se dejó 1 lechón testigo. A todos se les dió un seguimiento clínico desde el nacimiento y a partir del desafío hasta su muerte, y a los sobrevivientes hasta los 22 días después de la inoculación. En el tercer experimento, se evaluó la protección pasiva conferida a lechones procedentes de cerdas vacunadas con la vacuna mencionada vs la EOA. Con tal finalidad, se vacunaron 2 grupos de 2 cerdas, cuando estaban en el tercer tercio de la gestación; en cada grupo se dejó 1 cerda control. Al parir, cada una permaneció con sus lechones. Cuando los del Grupo 1 (experimentales y testigos) tenían 7 y 8 días de edad, se desafiaron todos juntos, dentro de una cámara de aerosoles, con 30 ml X  $10^7$  DICC<sub>50%</sub>/PMVP-LPM/30 min. Y cuando los del Grupo 2 (experimentales y testigos) tenían 4, 6 y 7 días de edad, se desafiaron por separado, dentro de la cámara de aerosoles. Se hicieron 2 grupos de 5 lechones, de 7 días de edad (de la cerda no vacunada); los grupos 2A y 2B, se inocularon con 30 ml X  $10^{8.35}$  DICC<sub>50%</sub>/PMVP-LPM/55 min y con 30 ml X  $10^{4.35}$  DICC<sub>50%</sub>/PMVP-LPM/45 min, respectivamente. De los lechones de la cerdas vacunadas, se hicieron 2 grupos de 6; los grupo 2C (6 días de edad) y 2D (4 días de edad) se inocularon por separado, con una alícuota de 36 ml del mismo inóculo empleado para el Grupo 2A, durante 70 y 53 min, respectivamente. A todos se les dió un seguimiento clínico desde el nacimiento hasta que murieron y/o hasta los 35 días de edad. A partir del día 21, después de la primera vacunación, todos los vacunados, del primer experimento, no enfermaron pero sí desarrollaron títulos de anticuerpos (Acs) que se fueron incrementando y permanecieron altos al término del experimento (140 días); en ellos, el desafío actuó únicamente como un refuerzo antigénico, mientras que en los testigos sólo se estimularon Acs después del desafío. La vacuna mostró buena antigenicidad,

desafortunadamente se observaron reacciones inflamatorias transitorias en el área de la inyección; a los 160 días de edad, en la misma área de los jamones se observaron lesiones macro y microscópicas. En los 2 grupos inoculados del experimento 2, se observó una morbilidad del 100 %, con signos clínicos de la EOA. Las mortalidades fueron del 80 % y 60 % para los grupos A y B, respectivamente. El virus fue reaislado, del encéfalo de los lechones muertos, e identificado. El lechón testigo no enfermó. Ya contando con la dosis capaz de matar al 80 % de los lechones, ésta se utilizó posteriormente para evaluar la potencia de la vacuna en estudio. En el calostro de una cerda vacunada, del Grupo 1 (experimento 3), así como en su suero sanguíneo (SS), el día en que se desafiaron sus lechones se encontraron títulos de Acs IH (1:5) y SN (1:64-1:16); después del desafío, en los lechones procedentes de las madres vacunadas, no hubo hipertermia en el 80 % de ellos, ni signos clínicos en el 100 %; mientras que de los lechones testigos, el 85 % (6 de 7) mostraron hipertermia y todos manifestaron signos moderados de la EOA y se recuperaron; en un control se presentaron los signos nerviosos y la opacidad corneal; el día del desafío, 9 de 10 lechones experimentales tenían títulos de anticuerpos SN (1:4 a 1:32, con promedio de 1:20), que fueron descendiendo en los siguientes muestreos, hechos a los 14, 21 y 30 días de edad; los lechones testigos, empezaron a mostrar anticuerpos a los 14 días después del desafío. El día del desafío, en el calostro y en el SS de las 2 cerdas vacunadas (Grupo 2), hubieron buenos títulos de Acs; el 100 % de los lechones, procedentes de madres vacunadas, no enfermaron ante el desafío; mientras que en los controles del Grupo 2A se observó una morbilidad del 100 % y en el Grupo 2B una morbilidad del 80 % y una mortalidad del 60 %; el día del desafío, todos los lechones, desafiados y no desafiados, de madres vacunadas, mostraron Acs maternos, con títulos IH de 1:5 a 1:40 y títulos SN de 1:16 a  $\geq$  1:128; mientras que las cerdas controles de ambos grupos y sus lechones fueron negativos. Estos datos muestran que se cuenta con una vacuna inactivada efectiva y con un método adecuado para evaluarla.

**CAPITULO I**  
**INTRODUCCION GENERAL**

## ENFERMEDAD DEL OJO AZUL CAUSADA POR EL PARAMIXOVIRUS

### PORCINO

#### 1.1 Historia.

En 1981 se informó por primera vez en México de la presencia de una nueva enfermedad de los cerdos denominada "Síndrome del Ojo Azul o Cerdos Zarcos", la cual aparentemente hizo su aparición en el área porcícola de La Piedad, Michoacán, a principios de 1980 (5); el síndrome observado afectaba a cerdos de diferentes edades, en los que había: opacidad azul turquesa en uno o en ambos ojos, hepatitis, morbilidad del 30 al 40% y mortalidad del 1% o menos (5, 6 y 7). En otro trabajo se informó de la aparición de la enfermedad, en mayo de 1980, en lechones lactantes de 4 a 10 días de edad, en donde la morbilidad fue del 20 % y la mortalidad del 90%. En ese brote que duró 8 semanas, murieron aproximadamente 600 lechones. Los animales morían entre los 2 y 7 días después de la aparición de los primeros signos, que eran de tipo nervioso y opacidad de la córnea (OC). De los animales afectados se aisló por primera vez un virus hemoaglutinante (HA) (66 y 67).

En 1984, en el Laboratorio de Virología de Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología Veterinaria (CENID-MV), del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP), SARH, en Palo Alto, D.F., Martínez et al., aislaron un virus, que mostró propiedades hemoaglutinantes, a partir del encéfalo de un cerdo, que provenía de una granja de engorda localizada en el área de La Piedad, Michoacán (38, 39 y 40). En la granja afectada se había presentado un síndrome caracterizado por encefalitis y OC (16) y mortalidad del 15 al 20% (38 y 40). Y al inocular con el espécimen original, diluido 1:5, a un cerdo normal, por las vías intramuscular (IM), intravenosa (IV), subcutánea (SC), conjuntival, oral y nasal (38 y 40), se reprodujeron en él, a partir del cuarto día postinoculación (PI), los signos clínicos de la enfermedad observada en la granja de engorda afectada; los cuales fueron: fiebre ligera (40.2 C), anorexia, depresión, conjuntivitis pronunciada, signos respiratorios y nerviosos, inflamación del área periorbital del ojo y exudado nasal; a partir del noveno día se presentó ceguera parcial, con ligera OC, torticolis, incoordinación, posición de "perro sentado", temores, desplazamiento en círculos, hundimiento de los flancos, disminución de la grasa subcutánea, debilidad, dificultad para levantarse y movimientos de pedaleo (38 y 40). Esta fue la primera ocasión en la que se notó, en cerdos inoculados experimentalmente, la presencia de signos respiratorios y exudado nasal, junto con signos nerviosos y OC; aunque esta última fue ligera.

También se inocularon dos cerdos de tres meses de edad; en uno de ellos, que fue inoculado por vía IM, se observaron signos respiratorios severos, estertores marcados y respiración abdominal de los 3 a los 10 días PI; al sexto día se empezó a notar conjuntivitis, lagrimeo, lagañas y ligera cianosis en la región ventral, ligeros signos de incoordinación, ijares un poco hundidos y lomo

arqueado. Mientras que el otro cerdo, que fue inoculado por las vías oral, nasal y conjuntival, a partir del séptimo día se observó conjuntivitis, lomo arqueado, diarrea y ligera respiración abdominal. Ambos cerdos mostraron respectivamente temperaturas máximas de 40.4 C y 40.1 C a los 16 días PI. Un tercer cerdo, sin inocular, fue mantenido en contacto con los otros dos anteriores, el cual mostró al séptimo día ligera congestión de mucosas oculares, lomo arqueado, ojos llorosos y el ojo derecho con ligera opacidad; y al octavo día hipersensibilidad y ligeros temores; las biometrías sanguíneas de los dos cerdos no mostraron cambios importantes (38 y 40).

#### 1.2 Otros paramyxovirus encontrados en cerdos.

En una comunicación presentada en 1986, se informa que en Israel se aisló un paramyxovirus, estrechamente relacionado al paramyxovirus aviar serotipo 3, a partir del exudado nasal de un cerdo clínicamente sano, y esto aparentemente no tiene mayor implicación, ya que la población porcina en tal país es muy pequeña (37), no obstante es probable que un número mayor de cerdos esté infectado y en el futuro quizás se convierta en un problema para la salud de los cerdos.

En otro trabajo presentado en 1988 se reporta que de 1392 sueros pertenecientes a cerdos de 195 granjas de Minnesota, E.U.A, 172 sueros (12.4 %) fueron positivos, con títulos iguales o mayores a 1.40, a anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación (IH) contra el virus de la parainfluenza tipo 3 (VPI-3) (96); lo anterior quiere decir que probablemente el VPI-3 sea de significancia en los cerdos (96). En otro comunicado, presentado en 1988, se informa del aislamiento en Italia de un VPI-3 a partir del cerebro de un cerdo que mostraba trastornos locomotores (18); aunque se trata de un solo caso, es probable que en el futuro se impliquen más cerdos y se convierta en un problema serio de salud para los cerdos.

#### 1.3 Impacto económico.

Desde un principio y hasta la fecha, se sabe que la EOA afecta principalmente a lechones lactantes, en los que se presenta en forma aguda y fatal, causando morbilidades del 20 al 65 % con mortalidades de casi el 100 % de los afectados (47, 52, 54, 66, 67 y 75). También se observó que en los cerdos "pepenados", se presenta junto con otras enfermedades, ocasionando importantes pérdidas económicas, ya que por ejemplo, durante un brote en una granja engordadora, se encontró un 50 % de morbilidad y 67 % de mortalidad y los animales que no murieron tuvieron un retraso promedio de 45 días para alcanzar el peso de venta (105 Kg) (70). Posteriormente se observó, que las cerdas gestantes y los verracos, también se afectaban, ocasionando con ello importantes pérdidas económicas por infertilidad (8, 9, 71 y 90). En 1992, se estimaba que en el país, la EOA junto con otras 4



enfermedades de los cerdos (Rinitis Atrófica, Enfermedad de Aujeszky, Parvovirus Porcino y Gastroenteritis Transmisible) ocasionaban pérdidas por costos directos anuales de \$ 20 millones de dólares norteamericanos (22).

#### 1.4 Distribución.

La enfermedad hizo su aparición en el área porcícola de La Piedad, Michoacán, en 1980 (5, 6, 7, 66 y 67). Durante ese año la EOA afectó a cerdos de granjas de los estados de Guanajuato, Jalisco y Michoacán. Para diciembre de 1982, la enfermedad se difundió a cerdos de diversos centros porcícolas de esos estados (68). También en 1982 se diagnosticó en el Estado de México; y en 1983 se observaron brotes en el sur de Guanajuato, Hidalgo, Nuevo León, D.F., Tlaxcala, Yucatán, Tabasco y Querétaro; y en 1984 en Tamaulipas; estos brotes se diagnosticaron por aislamiento viral e identificación por inmunofluorescencia (IF), y mediante estudios serológicos (68, 75, 76, 80 y 87). Hasta 1984, se consideró que se habían presentado más de 500 brotes en el país (73); desafortunadamente en el trabajo en cuestión no se menciona si estos brotes fueron diagnosticados clínicamente, o mediante pruebas de laboratorio.

Otros grupos de investigadores han estudiado brotes de éste síndrome; dos en 1984 en La Piedad, Michoacán, uno comprobado por aislamiento viral (38, 40 y 50); otro en la misma área, en 1987, comprobado por serología y por aislamiento viral (43); otros 3 en el Estado de México, en 1987, comprobados por serología (43); y uno por el rumbo del Lago de Guadalupe, Edo. de México, comprobado por aislamiento viral (54). Un caso sospechoso en Jalisco en 1984, diagnosticado con base en los signos clínicos (30). Y otro brote en 1991 en Tamaulipas comprobado por serología (46).

En diciembre de 1986, se hizo la aclaración de que las pruebas serológicas que se hicieron a cerdos procedentes de los rastros de Yucatán y Tabasco; aparentemente provenían del Bajío (87).

En un estudio serológico retrospectivo, se encontraron anticuerpos IH contra el Paramyxovirus Porcino de La Piedad, Michoacán (Pp-LPM), en sueros colectados y congelados desde 1972 a 1985 procedentes de: Edo. de México, Sonora, Guanajuato, Morelos, Puebla y Michoacán (60 y 63).

Entre los años de 1988 y 1989, la enfermedad fue detectada en los estados de Puebla, Campeche, Quintana Roo, Sonora y Morelos; ésto se realizó por aislamiento viral y serología (11 y 24), y nuevamente se informa de casos ocurridos en Jalisco, Michoacán, Guanajuato, Querétaro y el Edo. de México (24). Aparentemente esta enfermedad sólo se ha reportado en México.

### 1.5 Sinonimias de la enfermedad y del virus.

Inicialmente a la enfermedad se le denominó Síndrome del Ojo Azul (Blue eye syndrome), *Cerdos Zarcos* y *Ojo azul*, debido a la coloración que adquiría la córnea transparente (5, 6 y 7); al principio se aisló un virus HA (66), que después fue denominado Virus del Síndrome del Ojo Azul (VSOA) (75, 78 y 79); posteriormente, a éste mismo virus se le llamó Paramixovirus de Ojo Azul (POA) ("blue eye" Paramyxovirus) (88 y 89). En 1986, el virus inicialmente aislado fue parcialmente caracterizado como un nuevo miembro de los Paramixovirus (81); mientras que el virus aislado en 1984, fue también parcialmente caracterizado en 1986 (16), observándose que era semejante a un paramixovirus (38 y 40), y se le denominó virus LPM (La Piedad, Michoacán, México); debido a que el virus fue aislado del cerebro de un cerdo proveniente de La Piedad, Michoacán (16 y 50). También en 1986, se realizó la caracterización más completa de este virus, el cual fue designado virus LPM (50). Recientemente en 1994, en un symposium realizado en Puebla, México, se llegó a un consenso general de que al virus en lo sucesivo se le denominará Paramixovirus porcino (PMVP) y a la enfermedad que ocasiona Enfermedad del Ojo Azul (EOA) (21).

### 1.6 Etiología.

Inicialmente se aisló un virus hemoaglutinante que producía efecto citopático (ECP) con formación de sincitios (66 y 67); y posteriormente se hicieron otros aislamientos (38, 40, 43, 50 y 54). Mediante la inoculación de cerdos, se ha demostrado que este virus es el agente causal de la enfermedad; ya que, excepto la OC, inicialmente se lograron reproducir los mismos signos clínicos y lesiones observadas durante los brotes (40, 69, 71 y 72). No obstante que la OC completa no pudo ser reproducida en los primeros experimentos; en un experimento hecho a fines de 1994, se informa que se logró reproducir ligera OC en dos cerdos inoculados (38); y en 1988, en varios trabajos se menciona que la OC se reprodujo experimentalmente en lechones de diferentes edades (26, 27, 44, 51 y 89); con lo cual se cumplió con los postulados de Koch. De los diferentes aislados del PMVP, por el grupo de investigadores de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), el virus aislado en 1981 fue denominado VSOA (75, 78 y 79), y a los virus aislados posteriormente les denominaron POA (11 y 89); mientras que a los aislados por el grupo de investigadores del CENID-MV, se les denominó Paramixovirus porcino (43), y particularmente al aislado en 1984, se le llamó LPM, ya que fue aislado en La Piedad, Michoacán (16 y 50). Existen ciertas semejanzas entre estos virus aislados; y muy probablemente se trate del mismo virus, sin embargo se requieren pruebas serológicas específicas que permitan relacionarlos (38, 39 y 40).

## 1.7 Características del Virus.

### 1.7.1 Células empleadas en el aislamiento del PP-LPM.

El Pp-LPM fue aislado en 1984 en células de coneto de bovino (CB) (38). También se aisló en la línea de células de riñón de cerdo (PK-15) y en la línea de células de riñón de bovino (MOBK) (38, 50 y 54); el virus en cuestión se replica en una amplia variedad de células (38, 40 y 50).

### 1.7.2 Propiedades fisicoquímicas.

Entre sus propiedades fisicoquímicas, tiene la de hemaglutinar eritrocitos de pollo, gallina, cobayo, bovino, cerdo, caballo, perro, gato, hamster, conejo, oveja, cabra, ratón, rata, pavo y humano tipos (A, B, AB y O) (38, 50, 75, 76, 81 y 87).

Los títulos hemoaglutinantes más altos, utilizando al Pp-LPM, se obtuvieron con eritrocitos de pollo, cobayo y pavo (títulos de 1:128 ó 1:256). El PMVP también posee actividad: hemoadsorbente (HAD) con eritrocitos de las especies antes señaladas, en células PK-15; hemolítica; y de neuraminidasa, el fenómeno de elusión de eritrocitos ocurre entre 30 y 50 minutos de incubación a 37 C (50, 75, 76, 81, 87 y 88).

El virus es sensible a los solventes de lípidos (éter y cloroformo); además tiene resistencia a la actinomicina D. Se inactiva a 56 C después de 4 h; la HA se pierde de las 48 a 60 h a 56 C (75, 76, 81, 87 y 88). Se desconoce cuanto tiempo resiste el virus en condiciones ambientales naturales.

Cruz et al, 1988, demostraron que en condiciones experimentales el Pp-LPM después de ser multiplicado en células PK-15 conserva sus propiedades HA e infectivas por más de 110 días, a 37 C; a 56 C sus propiedades HA se conservan por lo menos hasta 30 min, y su infectividad hasta los 15 o más min; a 87 C conserva su HA durante un min y su infectividad por lo menos 3 min (17).

Aparentemente se han encontrado diferencias de virulencia entre las cepas aisladas de diferentes brotes, en granjas engordadoras de cerdos (84 y 85); sin embargo, se requiere hacer más investigación al respecto.

### 1.7.3 Tamaño y morfología del Paramyxovirus Porcino.

Otros investigadores, al hacer observaciones en el microscopio electrónico de preparaciones hechas con el sobrenadante de células CB infectadas con el sexto pase del virus del Pp-LPM teñidas con tinción negativa, aprecian estructuras pleomórficas con proyecciones en la superficie externa de la membrana con tamaño aproximado de 185 nm (38, 40 y 50). En observaciones similares hechas con

el VSOA, el virión es pleomórfico, más o menos esférico, de 100 a 300 nm de diámetro, con una membrana que tiene proyecciones en su superficie, y nucleocápside; en las preparaciones también se pueden observar estructuras filamentosas correspondientes a nucleocápsides de Paramixovirus rotos; y partículas pequeñas que corresponden a material viral sin ensamblar (86). La estructura, la morfología y el tamaño de las partículas observadas coinciden con las de los paramyxovirus (65 y 98).

#### 1.7.4 Relaciones serológicas del Paramyxovirus Porcino con otros paramyxovirus.

Mediante pruebas de seroneutralización (SN), fijación del complemento, doble inmunodifusión e IH, los sueros hiperinmunes contra el virus de Parainfluenza humana tipos 1 (VPI-1), 2 (VPI-2) y 3 (VPI-3), Paperas, Sarampión, Virus Sincitial Respiratorio (VSR) y el de la Enfermedad de Newcastle (VENC) no reaccionaron contra el Pp-LPM. El suero anti-Pp-LPM no reaccionó contra el VPI-3 ni contra el VENC (50).

#### 1.7.5 Comparación de las proteínas estructurales del Paramyxovirus Porcino y otros Paramyxovirus.

El perfil de las proteínas estructurales, del patrón antigénico del Pp-LPM, fueron comparadas, por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (DSS-GPAA), con las de los virus de Parainfluenza bovina tipo 3 (VPIB-3) (cepa U-23) y de la Enfermedad de Newcastle (ENC) (cepa Montana). Por lo menos 4 proteínas fueron determinadas a partir del Pp-LPM, siendo su perfil similar al VPIB-3 (cepa U-23), pero un poco diferente al VENC (cepa Montana) (50). En otro trabajo utilizando el mismo método (DSS-GPAA), se analizaron y compararon las proteínas estructurales del Pp-LPM contra las de: VENC (cepas pichón Suecia 83, y La Sota), VPIB-3 aislado de bovino (cepa U23), y virus Sendai; encontrándose que el Pp-LPM fue muy similar al VENC, en lo referente a la movilidad de la proteína P (52 K); se observó una diferente movilidad de esta proteína P, en el caso del VPIB-3 y del virus Sendai (79 K). El virus LPM es similar al VPIB-3 en lo relativo a la movilidad de las proteínas hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y nucleoproteína (NP). Usando el marcaje con [<sup>3</sup>H]glucosamina se mostraron 2 glicoproteínas virales de 66 K y 59 K, que correspondieron a las proteínas HN y de fusión (F<sub>1</sub>), respectivamente. El marcaje con [<sup>32</sup>P]ortofosfato reveló un polipéptido de 52 K, que correspondió a la proteína fosforilada (P). El análisis de las nucleocápsides purificadas por ultracentrifugación en gradiente de cloruro de cesio, de virus tratados con detergente, reveló un polipéptido de 68 K, que correspondió a la proteína NP. También se identificaron otros 2 polipéptidos que correspondieron a las proteínas "large" (L) y de matriz (M), con pesos moleculares de aproximadamente 200 K y 40 K, respectivamente (93 y 94). Como en los demás miembros de la Familia

Paramyxoviridae (98) también se encontró la proteína celular de actina en el PP-LPM (93 y 94). Los investigadores que hicieron estos trabajos concluyeron que los resultados de estos estudios sugieren que el Pp-LPM es un virus genuino de cerdos, y que éste no muestra relaciones serológicas cruzadas con los otros Paramyxovirus estudiados hasta ahora. Y que debe ser clasificado como un nuevo miembro del género Paramyxovirus (93 y 94).

#### 1.7.6 Organización del genoma del Paramyxovirus Porcino.

El mapa genético del PP-LPM, es similar al descrito para otros paramyxovirus (98). De la terminación 3' a la terminación 5', el orden de los genes es NP, P, M, F, HN y L (36). El gene P consiste de 1374 nucleótidos incluyendo la señal poly(A) (3). Por lo menos tres proteínas pueden ser codificadas del gene, V de 249, P de 404 y C de 126 aminoácidos. Del Grupo de las Paperas, de los Paramyxovirus, el PP-LPM es el único virus con un marco de lectura abierta (ORF) para la proteína C (36). El gene M tiene una longitud de 1376 nucleótidos incluyendo secuencias no codificantes en las terminaciones 5' y 3', con una secuencia codificante para la proteína de 1107 nucleótidos (2). Esto da una proteína deducida de 369 aminoácidos con un peso molecular calculado de 41,667, que está de acuerdo con su movilidad en SDS-GPAA (93 y 94). El grado más alto de identidad la tiene con el gene M del virus de las Paperas, con una homología del 46 % y 55 % a nivel de aminoácidos y nucleótidos, respectivamente (2). La proteína M es rica en aminoácidos básicos y esto le da una carga positiva neta de + 17.5. Esto se ubica en el mismo rango de las proteínas M de los otros paramyxovirus (2). Esta carga positiva neta es de importancia para que la proteína interactúe con otros componentes virales y celulares (36). La proteína M interactúa con la nucleocápside y las glicoproteínas virales (36, 65 y 98) y se cree que esto guía al inicio del proceso de ensamblaje y gemación viral (36 y 98). El gene F posee 1845 nucleótidos, con un ORF que codifica 541 aminoácidos (4); este gene está más estrechamente relacionado al gene F del virus de las Paperas y del Virus del Sinio tipo 5 (SV5). No pudo ser encontrada una región codificante para la pequeña proteína hidrofóbica, como en el caso del virus de las Paperas y del SV5 (36). El gene de la proteína F codifica una proteína con un peso molecular de 58,311; la estimación del peso molecular en SDS-GPAA dió 59,000 para la subunidad  $F_1$  y 12,000 para la  $F_2$ ; esto dió un total de 71,000 para  $F_0$ . La homología total de aminoácidos es de 45 % para el SV5 y 42 % para el virus de las Paperas (36). El gene HN contiene un largo ORF de 1728 nucleótidos, que codifican la proteína HN de 576 aminoácidos (95). El peso molecular calculado de 63,324 es menor que el de 66K estimado por SDS-GPAA; esto probablemente se deba a la glicosilación de la proteína (36). La comparación de la secuencia de aminoácidos reveló la más cerrada relación con el SV5 (43%) y el virus de las Paperas (41 %) (36). Estos estudios muestran que el PP-LPM está más estrechamente relacionado al virus de las Paperas (2, 36 y 95). Los otros virus del grupo (SV5, VPI-2 y VPI-4)

estuvieron también relacionados al PP-LPM, lo cual puntualiza que probablemente tengan un ancestro distante común (36).

#### 1.7.7 Relación molecular del Paramyxovirus Porcino con otros paramyxovirus.

La secuencia de los nucleótidos demuestran claramente que el Pp-LPM es un Paramyxovirus genuino que no había sido descrito previamente pero que está relacionado al Grupo del virus de las Paperas. Al analizar las secuencias comparativas del gene M (proteína M) del Pp-LPM se reveló que éstas estaban más cercanamente relacionadas con el virus de las Paperas humanas con una homologación del 46 y 55 % a nivel de aminoácidos y de nucleótidos, respectivamente (2, 36 y 95). Adicionalmente el análisis de las secuencias de los nucleótidos y el complemento de los aminoácidos deducidos de los genes P (3), F (4) y HN (95) confirmaron esta relación. Algunas de las características que hacen único y distinguen al PP-LPM de los otros miembros del Grupo de las Paperas son que: el gene P tiene un ORF adicional con la posibilidad de codificar la proteína C de 126 aminoácidos (3 y 36) y carece de un gene que codifica para la pequeña proteína hidrofóbica, que sí esta presente en el genoma del virus de las Paperas y del SV5 (36).

#### 1.7.8 Clasificación preliminar del Paramyxovirus Porcino.

Los estudios moleculares de las proteínas estructurales y del genoma del Pp-LPM, confirman que el Pp-LPM está estrechamente ligado al grupo del virus de las Paperas, del Género Paramyxovirus, de la subfamilia Paramyxovirinae, perteneciente a la familia Paramyxoviridae (36).

Sin embargo, de acuerdo con el Comité Internacional para la Taxonomía de los Virus, en su reporte de 1991 informó que el Pp-LPM recientemente ha sido incorporado dentro de los Paramyxovirus aún no caracterizados (53).

#### 1.8 Replicación del virus.

Diferentes autores mencionan que este virus se replica en una amplia variedad de cultivos celulares, de origen porcino (cornete nasal, cultivo primario de riñón, plexo coroldeo, IBRs, PK-15A, PK-15B, testículo (TC)); bovino (cornete nasal, riñón, testículo (TB), tiroides, embrión (BEK), piel, paladar, plexo coroldeo); simio (vero, GMK); otras células tales como pulmón de visón; células fetales de humano; riñón de gato (CK); riñón de hamster (BHK21) y dermis de equino. En todas las células empleadas, los virus aislados produjeron ECP (38, 40, 50, 75, 76 y 88).

En muestras del sobrenadante de células PK-15 inoculadas con el Pp-LPM, se encontraron

títulos virales de hasta  $10^{11}$  Dosis Infecciosas para Cultivos Celulares (DICC)<sub>50%</sub>/ml, entre los 3 y 4 días PI (50).

En monoestratos de células PK-15 preparados en tubos de Lighton (TL) y en botellas de dilución de leche, se lograron las más altas concentraciones del Pp-LPM; con base en el ECP, los picos más altos aparecieron a las 34-78 h PI y estos se mantuvieron altos hasta las 89-130 h PI. Tomando como base la HA, los títulos más altos aparecieron entre las 55 y las 66 h PI y estos permanecieron altos (con fluctuaciones), hasta las 234-293 h PI (12, 13 y 14).

Por otra parte, otro de los aislados del PMVP denominado VSOA se replica en abundancia en los embriones de pollo de 6 días de edad inoculados por la cavidad alantoidea, con un período de incubación de 72 h (75, 76, 87 y 88).

Otros investigadores informaron que el Pp-LPM se replica en embriones de pollo de 5 y 11 días de edad, inoculados por las vías de: saco vitelino, cavidad alantoidea y saco amniótico (50).

En otro trabajo se menciona que, se inocularon embriones de pollo con diferentes diluciones del VSOA (5 embriones por dilución) por la cavidad alantoidea; y los líquidos alantoideos mostraron títulos HA mayores que los títulos inoculados. Y se observó que a mayor número de partículas infectantes inoculadas se obtenía un título viral mayor en la cosecha (57 y 58).

#### 1.9 Persistencia del virus en una granja.

Se desconoce el tiempo que persiste el virus en una población infectada, al igual que el tiempo que los animales enfermos, y/o los recuperados pueden permanecer diseminándolo. Se ha visto que aparentemente la inmunidad desarrollada es sólida y que el virus no se disemina por mucho tiempo (75, 76 y 87).

Se ha observado que en un brote pueden desaparecer, aparentemente, los signos clínicos y a los 18 días se presentan de nuevo (54). O que pueden seguir apareciendo casos clínicos de cerdos con Ojo Azul hasta los 8-10 meses después de iniciado el brote (79 y 82).

Una vez que la enfermedad desaparece clínicamente, generalmente no se presentan casos clínicos nuevos, a menos de que se introduzcan animales susceptibles; esto último se ha observado en granjas engordadoras con sistemas de producción continuo (75, 76 y 87).

En las granjas abiertas, o con ciclo de producción continuo, la enfermedad persiste por más tiempo; mientras que en las granjas cerradas, la enfermedad se autolimita entre los 6 a 11 meses después (79 y 82).

#### 1.10 Especies susceptibles.

Hasta ahora el cerdo es la única especie en donde se ha confirmado la enfermedad en forma natural (5, 6, 7, 8, 9, 10, 16, 38, 39, 40, 47, 50, 52, 54, 56, 66, 67, 70, 75, 76, 87 y 90) y experimental (16, 26, 27, 35, 38, 39, 40, 44, 45, 50, 51, 55, 69, 71, 72, 88, 89).

Se menciona que el 50% de los embriones de pollo (EP), de 6 días de edad, murieron en un periodo de 72 h cuando el virus fue inoculado en la cavidad alantoidea (75, 76 y 87).

Por otra parte, el Pp-LPM al ser inoculado en EP de 5 y 11 días de edad, por vía del saco de la yema, les provocó la muerte en 3 a 4 días; pero esto no sucedió cuando se inocularon en la cavidad alantoidea o en el saco amniótico; no se pudo detectar actividad HA en las suspensiones del saco vitelino o de líquido amniótico durante siete pases consecutivos. Sin embargo se demostró que sí había replicación viral al ser inoculados los fluidos de los embriones en células PK-15, mediante pruebas de HAD, presencia de ECP y HA. El Pp-LPM se adaptó a crecer en el saco vitelino y en el saco amniótico después de 10 pases seriados, mostrando altos títulos HA (1:8 a 1:64) (50).

En otro trabajo se menciona, que se inocularon con un aislado del virus del Síndrome del Ojo Azul (SOA) (con un título de  $10^{3.10}$  DL50 %), embriones de 8 días de edad. El lote viral mencionado, fue diluido y por cada dilución se inocularon 5 embriones por la cavidad alantoidea. Los embriones inoculados con las diluciones de 1:20 a 1:160, mostraron edema y hemorragias en la región cefálica, cervical y podálica, y estas lesiones llegaron a ser generalizadas en las membranas; en los embriones inoculados con la dilución de 1:320 se observaron pocas hemorragias en la región cefálica y cervical, con abundantes petequias en el resto del cuerpo; los inoculados con la dilución 1:640, presentaron petequias en la región cefálica y cervical con ligero edema en la región cefálica; y los inoculados con la dilución 1:1280, mostraron ligera hemorragia generalizada (57 y 58).

Los ratones adultos inoculados por vía IC, con 0,01 ml de un macerado de tejido nervioso (diluido 1:10 y filtrado a través de una membrana de  $0,45 \mu$ ), procedente de un cerdo muerto a causa del Pp-LPM y otros ratones de la misma edad inoculados por vía IC con una suspensión viral del quinto pase realizado en células PK-15, con títulos de  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml, mostraron temores y excitación, y murieron entre los 3 y los 5 días PI. De estos ratones se recuperó al virus, a partir de cerebro, pulmón, hígado y bazo. Con las muestras mencionadas, también se inocularon otros ratones por vía intraperitoneal (0,2 ml), pero estos permanecieron sanos (50).

En otro experimento, se inocularon por vía IC 18 ratones de aproximadamente 6 semanas de edad, con 0,02 ml del Pp-LPM (13<sup>a</sup> pase en células CB); se presentaron signos respiratorios, nerviosos y murieron a los 2 días PI; en un periodo de observación de 8 días, sólo murieron 7 ratones (41).

El conejo adulto fue resistente a la inoculación con el VSOA por vía IM, y únicamente desarrolló anticuerpos sin presentar signos (75, 76 y 87).



Se inoculó un perro mestizo, recién destetado, de cuatro semanas de edad, con el primer pase del Pp-LPM en células PK-15, del nacimiento de una tonsila, procedente de un cerdo infectado en forma natural; previamente se había aislado un virus similar al Pp-LPM en las mencionadas células. Se inocularon 2 ml por vía IM, 2 ml por vía SC, 2 ml por vía oral (suspendidos en la leche), 0.1 ml en el saco conjuntival de cada ojo, y 0.2 ml por instilación nasal (0.1 ml en cada fosa nasal). El perro estuvo en observación durante un mes sin que se presentaran signos aparentes (54).

En otros trabajos se encontró que algunas ratas capturadas en granjas porcinas, tenían anticuerpos IH contra el Pp-LPM. En una granja, 4 de las 12 cerdas estudiadas fueron positivas, con un título IH de 1:20 a 1:40, y únicamente el suero de una de las 9 ratas estudiadas, capturada en esa granja fue positiva, con título IH de 1:20. En otra granja, de 5 sueros de ratas estudiadas, 3 fueron positivas con títulos IH de 1:20, y sólo se estudió un suero de cerda, el cual fue negativa (61 y 62).

Por otro lado se inocularon 3 pécari de collar, machos, adultos de aproximadamente 2 a 3 años de edad y de 15 a 20 Kg de peso. Cada pécari se inoculó por vía intranasal (IN), en forma de aerosol, con 2 ml del tercer pase del Pp-LPM en células PK-15, que tenía un título por HA de 1:64. Los pécari 1 y 2 presentaron apatía y secreción nasal marcada; mientras que el pécari 3 mostró apatía, ligera incoordinación y secreción nasal. Las temperaturas fueron variables cada vez que se manejó a los animales, fluctuando entre 37.5 y 40.3 C, mostrando una disminución al día 70; los títulos de Acs IH se presentaron hasta el día 15 PI, en el pécari 1, el cual mostró un título de 1:128; y los pécari 2 y 3 mostraron un título de 1:256; los días 30, 70 y 95 PI, los tres pécari, que sobrevivieron al desafío, mostraron un título de 1:128 (23).

En otro trabajo se menciona que se inocularon 15 gatos adultos por vía intranasal; no mencionan ni el título del virus ni la cantidad utilizada en la inoculación; el virus no pudo ser aislado de varios tejidos; sólo se detectaron Acs a partir del día 14 PI, y los títulos de anticuerpos se incrementaron un poco el día 21 PI (1).

Se desconoce si el Paramixovirus porcino puede infectar o matar en forma natural a otras especies animales. Desde el primer brote de la enfermedad, descrita en 1980 en cerdos, no se ha informado que se presente en otras especies animales, ni en humanos (50, 75, 76 y 87).

#### 1.11 Formas de Transmisión.

Se menciona que la enfermedad se transmite a cerdos sanos por la introducción a la granja de cerdos infectados, provenientes de granjas afectadas; así como por vacunadores, veterinarios y por otras personas, que van de las granjas afectadas a las no afectadas (74, 75, 76 y 87).

En 5 explotaciones en las que se presentó la enfermedad, no se habían introducido cerdos hasta por 3 meses antes del inicio de la enfermedad; en 3 de ellas, se confirmó que no existían Acs

en los cerdos muestreados (10 %). Sin embargo, tenían antecedentes de haber estado en contacto con personas o vehículos provenientes de La Piedad, Michoacán. Lo anterior sugiere la diseminación de la enfermedad por personas o vehículos contaminados (75, 76 y 87).

Respecto a 2 granjas cercanas, localizadas en Toluca, Edo. de México, pertenecientes al mismo dueño y atendidas por el mismo Médico Veterinario, en una de las granjas, 15 cerdos de 40 kg de peso, enfermaron mostrando OC y en 13 de estos se encontraron anticuerpos IH contra el Pp-LPM (títulos de 1:5 a 1:80); mientras que en la otra granja, los cerdos no mostraron OC y en los 15 cerdos que se muestrearon no se detectaron anticuerpos IH (43). La aparente no transmisión de la enfermedad, entre estas granjas, probablemente se deba a las medidas sanitarias adoptadas por el Médico Veterinario. Se desconoce si existe algún mecanismo de transmisión por medio de la fauna silvestre, doméstica o la existencia de algún reservorio (75, 76 y 87). Se ha visto que la forma de transmisión es horizontal, de animales infectados hacia los animales susceptibles; y vertical de los vientres a los productos (45, y 69).

Se sospecha de la transmisión del Paramixovirus porcino, a través de la monta directa; y aunque esto no ha sido plenamente demostrado, se ha informado del aislamiento del virus en EP a partir del semen (8); y de un agente hemaglutinante a partir de semen (46); así como de hembras repetidoras cubiertas por estos sementales (8, 10 y 90).

#### 1.12 Patogenia.

Se menciona que la ruta natural de la infección es la nasofaringe; el sitio inicial de replicación viral parece ser la mucosa de los cornetes nasales y las tonsilas; cuando el virus se inocula intratraquealmente, el período de incubación se acorta (75, 76 y 87); y la inoculación IC acorta aun más el período de incubación, pero es probable que en ese momento se inicien los signos nerviosos, causando signos similares a los casos observados en brotes de lechones naturalmente infectados (74, 75, 77 y 87); la diseminación del virus en lechones es hacia el sistema nervioso central (SNC) y al pulmón; estos tejidos aparentemente son ricos en ácido siálico, que es el receptor específico del Paramixovirus porcino (59). Se desconoce como llega al encéfalo (75, 77 y 87). Se ha sugerido la diseminación al pulmón por vía sanguínea, ya que se ha aislado el virus de la sangre (75, 77 y 87). El pulmón es afectado invariablemente en cerdos de diferentes edades, incluso en un periodo corto posterior a la infección (75, 77 y 87). Al útero llega atravesando la barrera placentaria, lo que causa muerte embrionaria en cerdas que se encuentran en el primer tercio de la gestación y muerte fetal, momificaciones, mortinatos, e infección de los productos en cerdas con gestaciones avanzadas (45, 71, 72, 75, 77 y 87).

La viremia es importante en la diseminación del virus en el animal, aunque no se sabe como ocurre ésta, aparentemente debido a ella el virus llega al útero (75, 77 y 87).

En otro trabajo en el cual se inocularon 2 cerdas gestantes con el VSOA, se menciona que los hallazgos observados indican que el efecto reproductivo dependerá de la etapa de gestación en que ocurre la infección (71). Cuando la infección ocurre al inicio de la gestación se producen muertes embrionales, reabsorción y retorno al estro bajando la fertilidad (71); cuando ocurre a mediados de la gestación se produce muerte fetal con momificación, y al final ocasiona mortinatos (71). Cuando la cerda se infecta con tiempo suficiente para desarrollar anticuerpos, confiere inmunidad pasiva a los lechones en el calostro (71). Otro trabajo informa que, cuando una cerda gestante se infectó por las vías naturales (conjuntival, oral y nasal) a los 103 días de gestación, el Pp-LPM probablemente cruzó la barrera placentaria e infectó a 2 de 7 fetos, ya que parió un lechón muerto, otro con problemas nerviosos que murió inmediatamente (ambos con opacidad azul de la córnea) y 5 lechones clínicamente sanos, que inmediatamente ingirieron calostro y se protegieron, ya que no enfermaron ni murieron (45); esto último ha sido comprobado parcialmente, puesto que los lechones no infectados in útero, aparentemente, se protegen al ingerir calostro con anticuerpos contra el Pp-LPM (42 y 45). Al parecer el aborto no ha sido característico de la enfermedad (71).

La opacidad corneal, al parecer es debida a una respuesta inmunológica, probablemente de hipersensibilidad tipo III (75, 77, 83 y 87).

La patogenia del POA aun no está bien aclarada, en cerdos de engorda, aunque se ha aislado una cepa capaz de producir signos nerviosos y conjuntivitis en cerdos de 40 Kg (83).

En otro trabajo se informó que este virus produce deterioro en la calidad del semen, además de que se ha aislado al POA en embrión de pollo a partir del mismo semen (8, 9, 10 y 90).

#### 1.13 Período de incubación.

En condiciones experimentales en lechones inoculados con 2.8 ml del Pp-LPM con un título por ECP de  $10^{6.5}$  DICC<sub>50</sub>/ml, por las vías conjuntival, nasal y oral, el período de incubación varió entre 7 y 11 días PI en lechones de 7 días de edad (26). En cerdos inoculados por vía intranasal o intratraqueal con el VSOA se ha observado que en lechones de un día de edad se desarrollan síntomas nerviosos entre 20 y 66 h PI; en algunos cerdos destetados de 20 a 50 días de edad, se desarrollan signos nerviosos a los 11 días PI (91). De cuatro cerdos de 35 días de edad, inoculados con el Pp-LPM, uno mostró un período de incubación de 20 días y otro un período de 10 meses (26).

#### 1.14 Signos clínicos.

Los signos clínicos en condiciones de campo son variables dependiendo principalmente de la edad de los cerdos, la dosis y la virulencia del Paramyxovirus (5, 6, 8, 9, 30, 47, 54 y 75); en condiciones experimentales, también dependen además de los factores mencionados, de la vía de inoculación (26, 27, 35, 38, 44, 51, 55, 88).

##### 1.14.1 Signos clínicos en lechones lactantes.

En general los lechones menores de 21 días de edad son muy susceptibles; aunque en los primeros 7 días de vida la susceptibilidad es mucho mayor. De acuerdo con la información existente, la forma de presentación se podría clasificar en sobreaguda, aguda y crónica. En la forma sobreaguda se presentan letargia y postración súbita, así como muerte repentina en un periodo de 24-48 h; en la forma aguda, generalmente se ven postrados en decúbito lateral con signos nerviosos. Los primeros signos son fiebre, pelo erizado, lomo arqueado acompañado principalmente de constipación pero en ocasiones de diarrea; posteriormente se observan signos nerviosos progresivos de ataxia, debilidad, rigidez principalmente en los miembros posteriores, temblores musculares, posturas anormales (posición de "perro sentado" o apoyado de la trompa), marcha rígida o mediante brincos; el lechón continúa mamando mientras puede desplazarse hacia la madre. Algunos muestran hipersensibilidad, si son levantados chillan, hacen movimientos de pedaleo. Otros signos son letargia con algunos movimientos involuntarios, pupila dilatada, ceguera y en ocasiones nistagmo; algunos cerdos padecen conjuntivitis, ojos hinchados, lagrimeo, parpados pegados con legañas y OC generalmente unilateral, pero en ocasiones bilateral. Con frecuencia sólo se observa OC. En los casos agudos el lechón muere entre los 3 y los 5 días, después de la presentación de los signos (26, 69, 70, 74, 75, 76, 80, 83, 87 y 91); en los casos crónicos algunos lechones se llegan a recuperar (82).

En trabajos realizados de 1983 a 1986 se menciona que el porcentaje de lechones que muestran OC pueda variar desde 1 al 40 % (30, 68, 70, 73, 75, 76, 80, 83 y 87).

##### 1.14.2 Signos clínicos en cerdos mayores de 30 días de edad.

En cerdos de más de 30 días de edad, los signos clínicos son moderados, observándose anorexia, fiebre, estomudos, tos; mientras que los signos nerviosos son: apatía, ataxia, marchas en círculo, movimientos pendulares de la cabeza, conjuntivitis y OC uni o bilateral; siendo la mortalidad generalmente baja (75, 76, 87 y 91); De un grupo de 4 cerdos (machos y hembras) de 35 días de edad, inoculados con el PP-LPM, a los 20 días PI una cerda mostró tristeza, apatía, "orejas de gacela",

debilidad, incoordinación, temblor general, rigidez de manos, cifosis, postración, ceguera parcial, exudado mucopurulento en fosas nasales, lagañas y retraso considerable de peso; a los 42 días después de iniciados los signos murió (26); otra cerda, de la misma edad, a los 10 meses posinoculación presentó parálisis e incoordinación del tren posterior durante una semana y se recuperó (26).

#### 1.14.3 Signos clínicos en cerdas de engorda de 15 a 45 Kg.

En cerdas de engorda de 15 a 45 Kg, los signos clínicos se presentan después de un intenso manejo y consisten en: anorexia, pelo erizado, fiebre, conjuntivitis, incoordinación, caminata sin rumbo o en círculo, ceguera, toman posiciones anormales, parálisis de miembros posteriores, opistótonos, postración, convulsiones y muerte en un 20 %; se reporta que hasta el 30 % de los cerdos de engorda desarrollan OC, uni o bilateral (30, 70, 74, 78 y 91).

En un estudio en el que los cerdos se inocularon experimentalmente, además de los signos nerviosos y ligera OC, en uno se menciona la presencia de signos respiratorios (38 y 40).

#### 1.14.4 Signos clínicos en el pie de cría

Tanto las cerdas adultas como las primerizas sólo ocasionalmente desarrollan OC, predominantemente unilateral; en ambas se incrementa el retorno al estro, hasta los 45 a 50 días después de la monta inicial, persistiendo esto hasta los 6 a los 8 meses durante el brote, baja la fertilidad, hay nacimiento de lechones muertos y fetos momificados; algunas veces se presenta anorexia, depresión y letargia con cierta incoordinación (30, 68, 76, 80, 83 y 91).

Otros autores mencionan que el Pp-LPM no siempre presenta problemas reproductivos y nerviosos al mismo tiempo, por lo que pueden presentarse sólo problemas reproductivos sin signos nerviosos en los vientres (48).

En otro estudio se comunica que, una cerda de 103 días de gestación, sin anticuerpos IH contra el Pp-LPM e inmune a FPC al ser inoculada por vía conjuntival (0.4 ml), nasal (0.4 ml) y oral (2 ml), no mostró signos clínicos y parió 7 lechones; 5 nacieron clínicamente sanos; uno se encontró en decúbito lateral con debilidad y temblor generalizado; y el otro se encontró muerto; ambos lechones tenían una franca OC bilateral (44 y 45).

En otro trabajo, donde se analizó un brote de POA en 5 granjas; los signos clínicos de las cerdas fueron: infertilidad y reducción del porcentaje de nacimientos, número de lechones nacidos vivos e incremento de repelidoras, lechones nacidos muertos y momificados; mientras que en los sementales fueron: anorexia, fiebre, OC, orquitis y atrofia testicular generalmente unilateral (90). Del 29%

al 73% de la población de sementales de las 5 granjas, mostraron infertilidad; de los verracos infértiles: del 0% al 50 % presentaron orquitis y epididimitis: y del 33% al 62.5% manifestaron atrofia testicular (90).

En un brote de ojo azul en una granja de ciclo completo, con una población de 79 sementales, 15 % de éstos eran de raza pura y el resto eran híbridos. Los signos clínicos de la enfermedad se presentaron a las 10 semanas después de aparecer en el área de destete y engorda; veinticuatro (30 %) del total de los sementales, presentaron en un lapso de 30 días, lesiones graves en epidídimo y testículo; siendo los signos clínicos: anorexia, fiebre de 40 C, estreñimiento, OC unilateral, deterioro gradual de la condición física, orquitis aguda unilateral, desinflamación y atrofia del testículo dañado, epididimitis bilateral a nivel de cabeza con formaciones quísticas de consistencia dura, deterioro progresivo de la libido. Se observó mayor incidencia de orquitis y epididimitis en animales de raza pura, por lo que se tuvieron que eliminar en un 100 % de ellos (8 y 9). Aquí se informa que el 87.5% de los afectados mostraron orquitis seguida de atrofia y el 100% manifestó epididimitis (8 y 9).

En ambos trabajos mencionados (8, 9 y 90), se puede observar que, en brotes de campo de la EOA, el porcentaje de verracos con infertilidad, orquitis y epididimitis es variable. La EOA (8, 9, 55, 90) y la encefalitis B japonesa (19) aparentemente son las únicas enfermedades virales que ocasionen trastornos severos en el aparato reproductor del macho.

#### 1.15 Curso.

Al analizar un brote (al parecer combinado) de enfermedad del edema, SOA y otras enfermedades, en una granja de engorda, se observó que se afectaban únicamente cerdos de 15 a 40 Kg de peso (23 Kg en promedio). Se observaron dos patrones clínico-patológicos, uno agudo en animales en buen estado de carnes, donde los signos nerviosos progresaron rápidamente, muriendo el mismo día; en el otro, de curso más largo, al inicio los animales tenían buen estado de carnes, pero fueron perdiendo peso, hasta que murieron entre los 3 y 4 días después del primer signo (70 y 74).

El curso en forma experimental es un poco variable y depende de la virulencia del aislado, la dosis, las vías de inoculación y la edad de los lechones. En lechones de 1 día de edad inoculados con  $10^{4.5}$  DICC del POA por: vía IC, mostraron un período de incubación de 18 h y un curso de 72 h (3 días); vía IT, mostraron un período de incubación de 66 h (2.7 días) y un curso de 78 h (3.2 días); por vía IN, mostraron un período de incubación de 75 h y 96 h (3.1 y 4 días) y un curso de 18 y 24 días y se recuperaron; mientras que 1 lechón de la misma edad inoculado con un macerado al 10 % de donde se aisló al POA, mostró un período de incubación de 7 días; y el control de contacto, mostró un período de incubación de 19 días (88). Lechones de 7 días de edad, inoculados por las vías oral intranasal y conjuntival con  $2.8 \times 10^{8.3}$  DICC del Pp-LPM, los signos iniciaron a los 7 días PI con ligera

depresión; y a los 11 días PI se observó franca depresión; con un curso de 6 a 8 días (26). De un grupo de 4 cerdos (machos y hembras) de 35 días de edad, inoculados con el PP-LPM, por las vías y con la cantidad mencionada (26), en una cerda se observó un período de incubación de 20 días y un curso de 42 días (al final del cual murió); otra cerda, del mismo grupo, a los 10 meses posinoculación presentó parálisis e incoordinación del tren posterior durante una semana y se recuperó (26).

El cuarentenar cerdos, en áreas afectadas de la granja, ha ocasionado un aumento en el número de semanas que dura el brote. En granjas de ciclo completo, el brote agudo con mortalidad en lechones puede durar de 2 a 9 semanas, dependiendo del número de cerdos y del número de marranas que paran durante el brote (75, 76 y 87).

#### 1.16 Morbilidad y Mortalidad.

La morbilidad y la mortalidad son variables dependiendo principalmente de la edad. La enfermedad se caracteriza por afectar a lechones de 2 a 15 días de edad (75 y 87), con menos frecuencia se afectan cerdos destelados, en engorda o adultos (74 y 75). Los porcentajes de morbilidad y de mortalidad en lechones son variables, por ejemplo: la morbilidad en camadas afectadas varía del 20 al 90 %; mientras que la mortalidad de los que enferman van del 40 al 100 % (30, 54, 66, 67, 70, 75, 76 y 87), y la duración del brote según la literatura consultada varía de 2 a 9 semanas, dependiendo del tamaño de la piara.

En las granjas engordadoras, la mortalidad es baja (< 1 %) a menos que exista asociado con otros agentes etiológicos (75, 76 y 87); afectándose principalmente los cerdos de 15 a 45 Kg de peso (70, 74 y 78); y en cerdos mayores los signos neurológicos y la mortalidad son raros (76 y 78).

En otro trabajo se menciona que en un brote, en cerdos de engorda, la mortalidad fue del 15 al 20 %; sin embargo, no se realizaron estudios para investigar la asociación con otras enfermedades (38 y 40).

Durante un brote en una granja engordadora, se encontró un 50 % de morbilidad y 67 % de mortalidad, los animales que no murieron tuvieron un retraso promedio de 45 días para alcanzar el peso de venta (105 Kg) (70).

#### 1.17 Duración del Brote.

Se desconoce por cuanto tiempo persiste el virus en un hato infectado, y por cuanto tiempo diseminan virus los animales enfermos. Cerdos sanos sin Acs contra el VSOA, no enfermaron ni desarrollaron Acs cuando se pusieron en contacto con cerdos convalecientes, dos meses después de

la enfermedad (75, 76 y 87).

En una granja de 150 vientres afectada por el VSOA, en la cual se introdujeron 54 cerdos serológicamente negativos a la enfermedad, 6 meses después del brote, ninguno mostró signos de la enfermedad, sin embargo, en 25 cerdos se detectaron títulos ascendentes de anticuerpos IH. Sin embargo en el mismo trabajo se señala que, 30 cerdos libres de anticuerpos contra el VSOA se introdujeron en otra granja de 500 vientres, 11 meses después del brote; los cerdos no mostraron signos, ni se detectaron anticuerpos IH en los tres muestreos realizados, a intervalos de 21 días después de su introducción a la granja (79 y 82).

#### 1.18 Lesiones a la Necropsia

Generalmente se observan en lechones; ya que los cerdos mayores de 30 días no mueren como consecuencia directa de esta enfermedad; los cambios suelen ser moderados y en ocasiones pueden llegar a estar ausentes (75, 77 y 87).

En lechones se observa enflaquecimiento, neumonía en lóbulos craneales, atrofia serosa de la grasa coronaria, congestión pulmonar, moderada distensión gástrica con acumulación de leche, acumulación de fluidos con finas bandas de fibrina en cavidad peritoneal (la cual se observa con mayor frecuencia en cerdos que han permanecidos postrados), vejiga plétórica (51, 54, 69, 75, 77 y 87), heces constipadas a nivel de intestino grueso (69), Petequias en riñón y edema subcutáneo en región inguinal (51), congestión meníngea (69, 75, 77 y 87) y congestión en encéfalo (54).

La OC se puede observar unilateral o bilateralmente, aunque generalmente se observa unilateralmente y en cerdos de todas las edades (30, 66, 68, 70, 74, 75, 77 y 87).

La córnea con edema llega a tener un grosor de hasta de 3 mm en cerdos destetados o en engorda y convalecientes; su humor acuoso es escaso; también se observa en ocasiones la formación de una vesícula de 2 a 3 mm o úlceras en la capa externa de la córnea, y con menor frecuencia queratocono (75, 77 y 87).

De cerdas inoculadas experimentalmente, durante la gestación, se ha observado el nacimiento de lechones con OC bilateral, edema subcutáneo en la región abdominal, estómago distendido con meconio, Petequias en mucosa estomacal, neumonía en lóbulos apicales y cardíacos, líquido sanguinolento en cavidad torácica, hígado friable y congestionado, Petequias en miocardio, equimosis en la región de las coronarias, Petequias en mucosa intestinal, riñones friables, tonsilas congestionadas y congestión en meninges y encéfalo (44).

En un estudio experimental en cerdos de 27 días de edad inoculados con el VSOA por vía intranasal (IN), se encontró edema subcutáneo en la región inguinal y abdominal, Petequias en riñón, congestión en encéfalo y abundante exudado mucopurulento en tráquea y aumento del líquido



cefalorraquídeo (89); sin embargo a pesar de que, durante aproximadamente 9 días, mostraron secreción nasal serosa y estornudos (89) no se informa de lesiones en pulmón.

En los testículos de los sementales afectados, se observa orquitis con atrofia posterior, generalmente unilateral, disminución de hasta un 25% - 30% del volumen inicial del testículo afectado (8, 9 y 90); a la necropsia, macroscópicamente se observa edema, flacidez, fibrosis, atrofia, necrosis y granulomas (90). El epidídimo inflamado a nivel de la cabeza con granulomas (8, 9 y 90), atrofia y fibrosis (90), estructuras quísticas y abscesos (8 y 9), además de flacidez (8, 9 y 90), turgencia, edema y hematomas (90).

#### 1.10 Hallazgos Histopatológicos.

El estudio histopatológico permite observar cambios en los cerdos infectados en forma natural y experimental con el Pp-LPM y con VSOA, como son:

Encefalomielitis no supurativa, la cual se observa principalmente en sustancia gris del tálamo, cerebro medio, y en la corteza cerebral, con una marcada gliosis focal y difusa, necrosis marcada, infiltración linfocitaria perivascular, neuronofagia, necrosis neuronal y glial, meningitis y coroiditis (51, 66, 67, 69, 70, 75, 77, 78, 87 y 88). Además se observan cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos en las neuronas piriformes de la corteza cerebelar (51).

En pulmón se observó neumonía intersticial localizada, afectando los lóbulos apicales y cardíacos, caracterizada por un engrosamiento del septo alveolar por infiltración de células mononucleares (51, 66, 67, 69, 75, 77, 80, 87 y 88). Aún en cerdos sin signos nerviosos se observan daños microscópicos en el SNC (75, 77 y 87).

Hay tonsilitis moderada con descamación del epitelio y células inflamatorias en las criptas (69, 75, 77 y 87).

También se encontró necrosis del tejido linfoide de las tonsilas y depresión linfoide de los ganglios (40).

En ojo sólo se observan cambios en los cerdos que tienen OC; y ésta es atribuida a una probable reacción de hipersensibilidad tipo III (75, 77 y 83), en la que se puede apreciar edema corneal variable (75, 77, 78, 80, 87 y 88), queratitis y uveítis anterior (51, 78, 80, 83 y 88), infiltración de células mononucleares y neutrófilos en diferentes partes del ojo (endotelio corneal, unión esclerocorneal, ángulo iridocorneal, en el iris o en el nervio óptico), además degeneración axonal (51, 69, 75, 77, 80, 87 y 88), presencia de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos en epitelio corneal (51). En la capa interna de la córnea se observa en ocasiones una capa de macrófagos y de neutrófilos, así como aumento de la vascularización (75, 77 y 87).

En testículo se encontró: edema generalizado, hemorragias, túbulos seminíferos con necrosis

en todo su epitelio germinal, zonas con túbulos seminíferos carentes de epitelio germinal, áreas con ausencia de túbulos seminíferos y sustitución de ellos por tejido conjuntivo, células de Leydig con degeneración hidrópica y necrosis, infiltración linfocitaria multifocal y picnosis en las células basales del epitelio (8 y 9); así como granulomas, hiperplasia intersticial, infiltración mononuclear e hialinización vascular y tubular (90). A nivel de la cabeza del epidídimo: infiltración linfocitaria focal, áreas con ausencia de vellosidades del epitelio y degeneración hidrópica, tumefacción celular y nuclear con condensación cromatínica, zonas sin epitelio y pérdida de la arquitectura con invasión de espermatozoides al tejido conectivo y abundantes macrófagos fagocitándolos (8 y 9).

## 1.20 Diagnóstico.

### 1.20.1 Diagnóstico clínico.

La historia clínica, así como los signos clínicos clásicos de la enfermedad, dan base para el establecimiento de un diagnóstico clínico preliminar; sin embargo, es necesario demostrar la presencia del virus o de anticuerpos específicos contra el virus en el animal (43, 77 y 87), así como del genoma viral (3 y 36). La necropsia, el estudio histopatológico y las pruebas de laboratorio también ayudan al diagnóstico (75, 77 y 87).

### 1.20.2 Pruebas de Laboratorio.

#### 1.20.2.1 Pruebas serológicas.

Las pruebas serológicas establecidas para el diagnóstico de la EOA son: a) Inhibición de la hemaglutinación (IH) (29, 31 y 42), que es una prueba relativamente sencilla, económica y rápida, que no requiere de equipo muy costoso; b) Inmunofluorescencia (IF) (20, 15), es una prueba rápida; c) Seroneutralización (SN) (29, 31, 49), es la prueba de referencia, sin embargo es lenta y requiere de equipo costoso y personal especializado; d) Ensayo inmuno enzimático (ELISA) (15, 29 y 31), es una prueba que para su establecimiento requiere de equipo costoso y personal especializado, sin embargo una vez establecida es sencilla, rápida y se pueden trabajar grandes cantidades de muestras de suero.

#### 1.20.2.2 Aislamiento viral.

##### 1.20.2.2.1 Organos de elección para aislar y/o detectar al virus.

Los órganos de elección son: encéfalo (38, 39, 40, 69, 75, 77, 78, 80, 81, 84, 87, 88, 91 y 97); tonsila (56, 76, 78, 79, 81, 82, 85, 88, 89, 91 y 95); pulmón (75, 77, 78, 80, 81, 84, 87, 88 y 97); riñón e hígado (69 y 97); ganglios intestinales, sangre y cornetes nasales (69); semen en el caso de sementales (8); ojo (88); médula espinal cervical (97); corazón (69); exudado nasal (89).

##### 1.20.2.2.2 Aislamiento viral en cultivos celulares.

Los macerados de tejidos infectados se inoculan en cultivos celulares, esperando detectar el ECP dentro de las 24 a 48 h PI y a veces hasta 72 h (29, 38, 40 y 81); aunque también el ECP puede observarse en un 100 % hasta los 6 a 7 días PI (12).

##### 1.20.2.2.3 Aislamiento viral en ratones.

Se inoculan ratones lactantes de 5 días de edad, por vía IC, con el sobrenadante de macerados de tejidos infectados al 10 % en PBS, con pH de 7.2 y adicionado con 100 UI/ml de penicilina y 0.1 mg/ml de estreptomina; se espera la manifestación de signos nerviosos y muerte dentro de los 3 a 5 días PI (29).

##### 1.20.2.2.4 Aislamiento viral en embrión de pollo.

El VSOA se replica en abundancia en los EP de 6 días de edad inoculados por la cavidad alantoidea, con un período de incubación de 72 h (75, 76, 87 y 88).

Otros investigadores informaron que el Pp-LPM se replica en EP de 5 y 11 días de edad, inoculados por las vías de: saco vitelino, cavidad alantoidea y saco amniótico (50).

En otro trabajo se menciona que, al inocular EP por la cavidad alantoidea, al cosechar estos líquidos, mostraron títulos HA mayores que los títulos inoculados. Y se observó que a mayor número de partículas infectantes inoculadas se obtenía un título viral mayor en la cosecha (57 y 58).

### 1.20.2.3 Detección del agente viral en tejidos

#### 1.20.2.3.1 Inmunofluorescencia directa.

La inmunofluorescencia se realiza con conjugado específico para VSOA, y cortes de órganos congelados o improntas (29 y 75) de la porción anterior y media de la corteza cerebral y cerebelo (29). La inmunofluorescencia se observa en el citoplasma y núcleos oscuros de las células infectadas (29); también se puede utilizar monocapa celular infectada (75, 77 y 87).

#### 1.20.2.4 Detección del genoma viral en cerdos.

En cerdos infectados experimentalmente, se pueden detectar las proteínas virales y el ácido nucleico (36). Al usar la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), el gen P, que codifica la proteína P del PP-LPM, fue detectado en diferentes órganos (3 y 36).

### 1.21 Prevención.

Para prevenir y tratar de controlar esta enfermedad se sabe del uso de vacunas formalizadas, elaboradas informalmente, de las que se desconoce su efectividad, así como de vacunas inactivadas experimentales elaboradas con virus cultivado en monoestratos de líneas celulares continuas. Una de estas vacunas ha mostrado buena antigenicidad en cerdos de diferentes edades (99). Otras dos de estas vacunas han mostrado buenos resultados en condiciones de campo, ante el desafío natural (31, 32 y 34): en una de ellas se utilizó como antígeno vacunal el pase No. 48 del PP-LPM (31) y no obstante ello protegió, lo cual quiere decir que probablemente no hubieron cambios antigénicos importantes en el virus vacunal o si los hubieron estos fueron mínimos.

También se ha comunicado que otras 2 vacunas, empleadas en cerdas gestantes, han mostrado buenos resultados ante una prueba de potencia, al desafiar a los lechones de cerdas previamente vacunadas y la inmunidad pasiva protegió al 71 % y 81.5 % de los lechones, respectivamente (25 y 92). También se ha informado del uso de suero hiperinmune vs la EOA para conferir protección pasiva a lechones susceptibles (41). No obstante las medidas anteriores, las medidas sanitarias pertinentes se siguen recomendando para evitar la entrada de esta enfermedad a las piaras.

#### LITERATURA CITADA

- 1.- Arellanes A., E.; Fuentes R., M.; Carreón N., R.; Ramírez M., H. Inoculación experimental del paramixovirus de Ojo Azul en el gato doméstico (*Felis Catus*). Mem. XXXVII Congreso Nacional "AMVEC". Acapulco, Gro., México, 1992:7-9.
- 2.- Berg, M., Sundqvist, A., Moreno-López, J. and Linné, T., 1991. Identification of the porcine paramyxovirus LPMV matrix protein gene: comparative sequence analysis with other paramyxoviruses. *J. Gen. Virol.*, 72:1045-1050.
- 3.- Berg, M., Hjertner, B., Moreno-López, J. and Linné, T., 1992a. The P gene of the porcine paramyxovirus LPMV encodes three possible polypeptides P, V and C: the P protein mRNA is edited. *J. Gen. Virol.*, 73:1195-1200.
- 4.- Berg, M., Sundqvist, A., Moreno-López, J. and Linné, T., 1992b. The fusion protein gene of the porcine paramyxovirus LPMV.
- 5.- Campos M., E. Síndrome del Ojo Azul o Cerdos Zarcos. Mem. XVII Convención AMVEC-IXTAPA. Zihuatanejo, Guerrero, México, 1981.
- 6.- Campos M., E.; Calderón, E.; and Solorio, S. "The Blue Eye Syndrome", Síndrome del Ojo azul. Procc. of the 7th IPVS Congress. México, D.F., 1982:171.
- 7.- Campos M., E. Hallazgos recientes en Ojo Azul. Sureste Agropecuario, 1987;2(1):20.
- 8.- Campos H., R. F.; y Carbajal S., M. Trastornos reproductivos en los sementales de una granja porcina de ciclo completo ante un brote de Ojo Azul. Mem. XXIV Congreso Nacional "AMVEC". Morelia, Michoacán, México, 1989:62-64.
- 9.- Campos H., R.; Carbajal S., M. Infertility in boars associated with an outbreak of Blue Eye Syndrome. Joint IFS-SIPAR seminar on animal reproduction. Montevideo-Paysandú, Uruguay, 1990(2).
- 10.- Campos H., R., Guzmán, S. Utilización del examen androtógico e inseminación artificial en una granja del ciclo completo con el síndrome del Ojo Azul. Reporte de Campo. Guadalajara, Jalisco, México, 1990.

- 11.- Carreón N., R.; Fuentes R., M.; Stephano H., A.; Ramírez M., H. Estudios preliminares del Paramyxovirus del Ojo Azul en la República Mexicana. Mem. del curso de actualización de enfermedades virales del cerdo; UNAM-AMVEC, México, D.F., 1989:78-82.
- 12.- Colinas T., A. Curva de multiplicación del paramyxovirus porcino LPM en la línea celular PK-15, con base en el título viral, determinado por hemaglutinación y por efecto citopático. Tesis licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, Estado de México. 1989.
- 13.- Colinas T., A.; Martínez L., A.; Correa G., P.; Fajardo M., R. Curva de crecimiento del paramyxovirus porcino de La Piedad, Michoacán, en líneas celulares Pk-15. Mem. del II congreso ALVEC; XII convención AMVEC; II encuentro UNPC. Acapulco, Guerrero, México, 1987:68-71.
- 14.- Colinas T., A.; Martínez L., A.; Correa G., P.; Fajardo M., R. Ciclo de crecimiento del paramyxovirus porcino Pp-LPM en células Pk-15. En: XI Reunión ALPA, La Habana, Cuba, 1988:195.
- 15.- Colmenares V., G.; Cuevas R., S.; Guzmán H., M.; Sánchez G., S.; De Paz, V. O.; Ruiz M., M.; Tapia L., M.; Y Adere, B. Concordancia entre las pruebas dot-ELISA, ELISA indirecta y seroneutralización para diagnóstico del paramyxovirus porcino. En: Martínez P., R (ed.) Memorias Reunión Nal. de Invest. Pec. en México. México, D.F. Vet. Méx. Supl. 2;1995(26):120.
- 16.- Correa-Girón, P.; Martínez, A.; Ericsson, A. and Moreno-López J. Characterization of a paramyxovirus isolated from the brain of a piglet in Mexico. proc. of the 9th IPVS Congress, Barcelona, Spain, 1988:205.
- 17.- Cruz G., H.; Martínez L., A.; Correa G., P.; Colinas T., A. Viabilidad del paramyxovirus porcino de La Piedad, Michoacán (Pp-LPM) a diferentes temperaturas. Mem. XXIII Congreso Anual AMVEC. León, Guanajuato, México, 1988:84-88.
- 18.- Chiocco, D. Segnalazione del primo isolamento in Italia del virus parainfluenza 3 (PI-3) dal cervello di un suino. Acta Med. Vet. 1988(34):215-217.
- 19.- Chu, R.M. and Joo H.S. Japanese B encephalitis. in Mengeling, W.L. (ed.) Diseases of swine, 7th ed. Ames, Iowa, U.S.A. 1992:288-292.

- 20.- Díaz O., A.; Sundqvist A.; Fuentes M.; Reyes L., J.; Moreno L., J.; Hernández J., P. Correlación entre IH, SN y ELISA en sueros de cerdos infectados en forma natural con paramyxovirus de ojo azul (POA) y una vacuna experimental. Mem. de la Reunión Nacional de Investigación Pecuaria en México. México, D.F., 1989:82.
- 21.- First International Symposium upon Pig Paramyxovirus. Puebla, Pue., México. Nov. 21, 22 and 23, 1994.
- 22.- Flores H., A.O. Riesgo de introducción de enfermedades exóticas de los cerdos a México. En: Morilla, A. y López, J. (eds.) Symposium sobre enfermedades del cerdo con implicaciones en el comercio internacional. México, D.F. 1992:86-89.
- 23.- Flores J., J.I. Inoculación experimental del paramyxovirus del ojo azul (POA) en pécari de collar (Dicotyles Tajiacu). Tesis Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 1991.
- 24.- Fuentes, M.; Carreón N., R.; Stephano H., A.; and Trujillo, M. Frequency of Blue Eye Paramyxovirus Antibodies in Mexico Pigs. Proc of the 11th IPVS Congress. Lausanne, Switzerland. 1990:274.
- 25.- Fuentes R., J.M. Evaluación de una vacuna experimental contra ojo azul en cerdos mediante las pruebas de inmunogenicidad inocuidad potencia y medición de la Inmunidad pasiva en lechones. Tesis licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 1993:30.
- 26.- Galina P., L.; Martínez L., A.; Correa G., P.; Colinas T., A.; Anaya E., A.M.; Ramírez N., R. Estudio experimental en cerdos de diferentes edades Infiltrados por vías naturales con el paramyxovirus porcino de La Piedad, Michoacán (PpLPM). Mem XXIV Congreso Nacional "AMVEC". Morelia, Michoacán, México, 1989:59-61.
- 27.- García G., J.; Camacho M., J.; Mendoza E., S.; Ciprián C., A.; González G., S.; Stephano H., A. Infección experimental con el virus de ojo azul y Pasteurella Multocida en cerdos convencionales. Mem. XXIII Congreso Anual "AMVEC". León, Guanajuato, México, 1988:87-89.
- 28.- Gay G., M. Implementación de la prueba de ellsa, para el serodiagnóstico de ojo azul en cerdos. Tesis licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 1989.

- 29.- Gay G., M. Pruebas de laboratorio para el diagnóstico de ojo azul Mem del curso sobre actualización de enfermedades virales del cerdo. UNAM-AMVEC. México, D.F., 1989:83-84.
- 30.- Guillén A., H.; Barba L., R. J. Estudio de un brote de una nueva enfermedad denominada síndrome del ojo azul de los porcinos. Mem II Congreso Nacional "AMVEC". Mazatlán, Sinaloa, México, 1984:100-101.
- 31.- Hernández J., P.; Sundquist, A.; Fuentes, M.; Díaz O., A.; y Moreno L., J. Evaluación de una vacuna experimental para el paramixovirus del síndrome del ojo azul. Mem XXV Congreso Nacional "AMVEC". Pto. Vallarta, Jalisco, México, 1990:57-60.
- 32.- Hernández-Jáuregui, P.; Díaz O., A.; Reyes L., J.; Hernández-Baumgarten, E.; Moreno L., J. Desarrollo y evaluación de una vacuna experimental contra el paramixovirus porcino. In: First International Symposium upon Pig Paramixovirus. Puebla, Pue., México. 1994:30-40.
- 33.- Hernández-Jáuregui, P.; Sundquist, A.; Berg, M.; Linné T.; Moreno L., J.; y Gómez C., E. Análisis Ultraestructural y determinación de las proteínas estructurales del paramixovirus LPM-V del síndrome del ojo azul. Mem XXV Congreso Nacional "AMVEC". Puerto. Vallarta, Jalisco, México, 1990:54-56.
- 34.- Iglesias, G.; Rincón, F.; Vásquez, B.; Tapia, J. y Domínguez, F. Evaluación de una vacuna para la prevención de la enfermedad causada por el Paramixovirus porcino. In: First International Symposium upon Pig Paramixovirus. Puebla, Pue., México. 1994:43-44.
- 35.- Kennedy, S.; Carroll, B.; McConnell, S.; Herron, B.; McNeilly, F.; Allan, G.; Walker, I.; Adair, B.; Hernández-Jáuregui, P.; and Linné, T. Experimental LPM Paramyxovirus infection in pig: histological and immunohistochemical findings. In: First International Symposium upon Pig Paramixovirus. Puebla, Pue., México. 1994:51.
- 36.- Linné, T.; Berg, M.; Bergvall, A., C.; Hjertner, B.; and Moreno-López, J. The molecular biology of the porcine paramyxovirus LPMV. Veterinary Microbiology, 1992(33):263-273.
- 37.- Lipkind, M.; Shoham, D.; and Shihmanter, E. Isolation of a paramyxovirus from pigs in Israel and its antigenic relationships with avian paramyxoviruses. J. Gen. Virol. 1986(67):427-439.



- 38.- Martínez L., A.; Correa G., P.; Fajardo M., R.; Garibay S., M. Aislamiento y estudio de un virus porcino parecido a los Paramyxovirus. En: Correa, P. y Morilla, A. (eds.) Encuentro Sobre Enfermedades Infecciosas del Cerdo. México, D.F., 1985:15-21.
- 39.- Martínez L., A.; Correa G., P.; Fajardo M., R.; Ramos R., I.; Garibay S., M.; Moreno L., J. Un virus parecido a los Paramyxovirus productor de signos respiratorios, nerviosos y mortalidad en cerdos. Res. XVI Congreso Nacional de Microbiología. AMM. Durango, Durango, México, 1985:83.
- 40.- Martínez L., A.; Correa G., P.; Fajardo M., R.; Garibay S., M.; Moreno L., J.; Ramos R., I.; Rosales E., F. Un virus hemoaglutinante similar a los Paramyxovirus que producen encefalitis y mortalidad en cerdos. Mem. Reunión de Investigación Pecuaria en México. México, D.F., 1985:81.
- 41.- Martínez L., A., (1986). Comunicación personal.
- 42.- Martínez L., A.; Correa G., P.; Rosales E., F.; Vásquez P., C.; y Garibay S., M. Títulos de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación (IH) contra el Paramyxovirus de La Piedad, Michoacán (LPM) en cerdos de diferentes edades. Proc. of the 9th IPVS Congress. Barcelona, Spain, 1988:313.
- 43.- Martínez L., A.; Colinas T., A.; Correa G., P.; Ramírez N., R.; Garibay S., M.; Coss, M.; Báez R., A.; Caba A., M.A. Determinación de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación contra el Paramyxovirus LPM en cerdos con signos nerviosos, con y sin opacidad de córnea. Mem. II Congreso ALVEC, XII Convención AMVEC, III Encuentro UNPC. Acapulco, Guerrero, México, 1987:76-78.
- 44.- Martínez L., A.; Correa G., P.; Colinas T., A.; Galina P., L., (1988). Opacidad corneal bilateral en lechones de una cerda inoculada en el Paramyxovirus porcino de La Piedad, Michoacán (P-LPM). Mem. Reunión de Investigación Pecuaria en México. México, 1988:54.
- 45.- Martínez L., A.; Correa G., P.; Colinas T., A.; Galina P., L. Opacidad corneal bilateral congénita en lechones de cerdas expuestas al Paramyxovirus porcino de La Piedad, Michoacán. Mem. XIV Congreso Nacional "AMVEC 89". Morelia, Michoacán, México, 1989:56-58.
- 46.- Martínez L., A.; Correa G., P.; Sánchez P., F.; Ramírez N., R. Estudio epidemiológico del síndrome del Ojo Azul (SOA), producido por el Pp-LPM en granjas de 6 estados y del D.F. Res. XXII Congreso Nacional de Microbiología. AMM. Acapulco, Gro., México, 1991:42.

- 47.- Martínez L., A.; Correa G., P.; Colinas T., A. Síndrome del Ojo Azul producido por el Paramyxovirus porcino. Folleto editado por el CENID-Microbiología, INIFAP, SARH. México, D.F., 1991:42.
- 48.- Martínez L., A.; Correa G., P.; Ontiveros C., M. A.; Moles, P.; Sánchez P., F.; Ramírez N., R. y Fraire C., M. Estudio de varios brotes ocasionados por el Paramyxovirus porcino de La Piedad, Michoacán (Pp-LPM) y su diagnóstico diferencial con: Fiebre Porcina Clásica (FPC), Parvovirus porcino (PVP), Brucelosis y Leptospira. Mem Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. Ciudad Victoria, Tamaulipas, México, 1991:229.
- 49.- Martínez L., A.; Correa G., P.; Coba A., M.A.; Zamora G., J. Advances in the evaluation of a experimental vaccine against porcine paramyxovirus (PPMV). In: First International Symposium upon Pig Paramyxovirus. Puebla, Pue., México. 1994:41-42.
- 50.- Moreno-López J.; Correa-Girón P.; Martínez A., and Ericsson, A. Characterization of a paramyxovirus isolated from the brain of a piglet in Mexico. Arch Virol. 1986(91):221-231.
- 51.- Pérez P., F. Lesiones histológicas en lechones inoculados experimentalmente con el Paramyxovirus del Ojo Azul. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F. 1989.
- 52.- Pérez P., F.; Flores C., J. y Roa A., F. Impacto en la productividad de una granja lechonera afectada por gastroenteritis transmisible y ojo azul. Mem. XIV Congreso Nacional "AMVEC". Morelia, Michoacán, México, 1989:195-197.
- 53.- Pringle, C.R. Family Paramyxoviridae. In: Francki, R.I.B.; Fauquet, C.M.; Knudson, D.L.; Brown, F. (eds.). Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the International Committee on Taxonomy of viruses. Arch. Virol. Suppl 2, 1991:245.
- 54.- Ramírez N., R.; Martínez L., A.; Correa G., P.; Colinas T., A. Un brote de paramixovirosis encefálica en cerdos de una granja del Estado de México. Mem. II Congreso ALVEC, XII Convención AMVEC, III Encuentro UNPC. Acapulco, Guerrero, México, 1987:64-67.

- 55.- Ramírez M., H.; Nápoles R., C.; Ruíz S., L.; Mercado G., C.; Guerrero D., J.; y Hernández-Jáuregui, P. Patogénesis de la cepa del paramyxovirus porcino PAC-3 en el aparato reproductor del cerdo. II Lesiones macro y microscópicas. In: First International Symposium Upon Pig Paramyxovirus. Puebla, México, 1994:49.
- 56.- Ramírez T., C.; and Stephano H., A. (I); Histological central nervous system lesions produced by an hemagglutinating virus in naturally infected piglets. Proc. of the 7th IPVS Congress. México, D.F. 1982:154.
- 57.- Ramírez H., M; Mendoza M., M. L.; Méndez C., I; Salazar M., A. M. Alteraciones macroscópicas en embrión de pollo por efecto del virus del Síndrome del Ojo Azul del cerdo. Tiempos de Ciencia, 1992(28):53-58.
- 58.- Ramírez H., M. Mendoza M., M.L.; Méndez C., I.; Ortiz G., G.; Barba L., R.J. Efecto del Paramyxovirus del Síndrome del Ojo Azul sobre el embrión de pollo. Res. XXI Congreso Nacional de Microbiología. AMM. Villahermosa, Tabasco, México, 1990:18.
- 59.- Reyes-Leyva, J.; Hernández-Jáuregui, P.; Montaña L., F.; and Zenteno, E. The porcine paramyxovirus LPM specifically recognizes slaly (alfa 2,3) lactose-containing structures. Arch. Virol. 1993 (133):195-200.
- 60.- Rosales E., J.A.F. Estudio retrospectivo de la presencia de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación contra el Paramyxovirus porcino de La Piedad, Michoacán (LPM), aparentemente asociado con el Síndrome del Ojo Azul, en sueros de cerdos colectados de 1972 a 1986. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan, UNAM, Estado de México, 1987.
- 61.- Rosales E.,F.; Ramos R.,I.; Sánchez M., P.H.; Correa G., P. Anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación (IH) contra el Paramyxovirus porcino LPM en cerdos y ratas de las mismas granjas. Mem. XXI Reunión Nacional. Asociación Mexicana de Producción Animal. Cd. Victoria, Tamaulipas, México, 1987:164.
- 62.- Rosales E.,F.; Ramos R.,I.; Sánchez M., P.H; Zepeda M., de O.; Correa G.,P. Seroprevalencia de anticuerpos contra la enfermedad de Aujeszky y el Síndrome del Ojo Azul en cerdos y ratas de granjas. Res. XI Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Lima, Perú, 1988:53.

- 63.- Rosales E., J.A.F., Ramos R., I.; Martínez L., A.; Correa G., P. Análisis retrospectivo (1972-1986) de la presencia de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación contra el Paramyxovirus porcino LPM, al parecer asociado con el "Síndrome del Ojo Azul". Téc Pec Méx, 1988(26)3:304-311.
- 64.- Rosales E., I.; Correa G., P. El Síndrome del Ojo Azul (revisión bibliográfica). Téc Pec Méx, 1989(27);3:101-116.
- 65.- Scheid, A. Paramyxoviridae. In: Nermu/Steven (eds.) *Animal virus structure*. Elsev. Sc. Pub. 1987:233-252.
- 66.- Stephano H., A.; Gay G., M.; Ramírez T., C.; Maqueda A., J.J. "Estudio de un brote de encefalitis en lechones por un virus hemoaglutinante" Mem. XVII Convención AMVEC-IXTAPA. Zihuatanojo, Guerrero, México, 1981.
- 67.- Stephano H., A.; Gay G., M.; Ramírez T., C.; Maqueda A., J. An outbreak of encephalitis in piglets produced by an hemagglutinating virus. Proc. of the 7th IPVS Congress. México, D.F., 1982:153.
- 68.- Stephano H., A.; Ramírez T., C.; Flores A., H. Situación actual del Síndrome de encefalitis y opacidad de la córnea, conocido como "Ojo Azul". Mem. Congreso Nacional AMVEC. Puerto Vallarta, Jalisco, México, 1983.
- 69.- Stephano H., A.; Gay G., M. El Síndrome del "Ojo Azul" estudio experimental. Mem. Reunión de Investigación Pecuaria en México. México, D.F., 1983:523-528.
- 70.- Stephano H., A.; Rodríguez, H.; Peralta R., C. Análisis de un brote de angiopatía cerebro espinal (Enfermedad del edema) y Síndrome del Ojo Azul en cerdos de una granja engordadora. Mem. II Congreso Nacional AMVEC. Mazatlán, Sinaloa, México, 1984:102-104.
- 71.- Stephano A. y Gay G., M. "Efecto del virus del ojo azul en la reproducción de la cerda" Mem. II Congreso Nacional AMVEC. Mazatlán, Sinaloa, México, 1984:83-85.
- 72.- Stephano H., A.; and Gay G., M. Experimental studies on a new viral síndrome in pigs called "blue eye", characterized by encephalitis and corneal opacity. Proc. of the 8th IPVS Congress. Ghent, Belgium, 1984(II):71.

- 73.- Stephano H., A.; Gay G., M. Síndrome del ojo azul en cerdos en México. Mem. Reunión de Investigación Pecuaria en México. México, D.F., 1984:138.
- 74.- Stephano H., A. Brotes de encefalitis en cerdos de engorda. Síntesis porcina, 1985;4(2):9-12.
- 75.- Stephano H., A.; Gay G., M. Síndrome del ojo azul en cerdos. En: Correa G., P.; y Morilla, G., A (eds.). Encuentro Sobre Enfermedades Infecciosas del Cerdo. AMVEC. México, D.F., 1985:1-13.
- 76.- Stephano H., A.; Gay G., M. Síndrome del ojo azul en cerdos. Síntesis Porcina, México, D.F., 1985;4(5):42-49.
- 77.- Stephano H., A.; Gay G., M. Síndrome del ojo azul en cerdos II. Síntesis Porcina, México, D.F., 1985;4(6):9-14.
- 78.- Stephano H., A.; Gay G., M. El síndrome del ojo azul en cerdos en granjas engordadoras. Mem. XX Reunión Nacional AMVEC. Mérida, Yucatán, México, 1985:71-74.
- 79.- Stephano H., A.; Doporto D., J.M.; Gay G., M. Estudio epidemiológico en dos granjas afectadas por el síndrome del ojo azul. Mem. XX Reunión Nacional AMVEC. Mérida, Yucatán, México, 1985:79-82.
- 80.- Stephano H., A.; Gay G., M. El síndrome del ojo azul. Una nueva enfermedad en cerdos asociada a un paramixovirus. Veterinaria México. 1986;XVII(2):120-122.
- 81.- Stephano H., A.; Gay G., M.; and Kresse J. Properties of a paramyxovirus associated to a new syndrome (blue eye syndrome) characterized by encephalitis, reproductive failure and corneal opacity. Proc. of the 9th IPVS Congress. Barcelona, Spain, 1986:455.
- 82.- Stephano H., A.; Doporto D., J.M.; Gay G., M. Estudio epidemiológico en 2 granjas afectadas por el síndrome del ojo azul. Proc. of the 9th IPVS Congress. Barcelona, Spain, 1986: 456.
- 83.- Stephano H., A.; Gay G., M. Encefalitis, trastornos reproductivos y opacidad de la córnea en cerdos (síndrome del ojo azul) asociados a un paramixovirus. Estudio cronológico. Medicina Veterinaria. España, 1986;3(7-8):359-362.

- 84.- Stephano H., A.; Gay G., M. Analisis de cepas de un nuevo paramixovirus aislado de 12 brotes de encefalitis y opacidad corneal en cerdos (síndrome del ojo azul). Res. XXII World Vet. Congress. Montreal, Canada, 1987:161.
- 85.- Stephano H., A.; Gay G., M. Análisis de cepas del virus del Síndrome del Ojo Azul aisladas de 12 brotes diferentes de encefalitis y opacidad de la córnea en cerdos. Mem. Reunión de Investigación Pecuaria en México. México, D.F., 1986:163.
- 86.- Stephano H., A. El síndrome del ojo azul y la investigación. Síntesis Porcina, México, D.F., 1986;5(12):14-24.
- 87.- Stephano H., A y Gay G., M. Encefalitis, falla reproductiva y opacidad de la córnea, ojo azul. Síntesis Porcina, 1986;5(12):26-39.
- 88.- Stephano H., A.; Gay G., M.; Ramírez T., C. Encephalomyelitis, reproductive failure and corneal opacity (blue eye) in pigs, associated with a paramyxovirus infection. Vet. Rec., 1988;122(2):6-10.
- 89.- Stephano H., A.; Fuentes R., M.; Hernández J., P.; Herradora L., M.; Carreón N., R. Encefalitis y opacidad de la córnea en cerdos destetados, inoculados experimentalmente con paramixovirus del ojo azul. Mem. XXIII Congreso Anual AMVEC. León, Guanajuato, México, 1988:90-92.
- 90.- Stephano H., A.; Hernández, D.; Pérez, C.; González C., T.; Ramírez M., H.; and Cervantes, A. Boar Infertility and testicular atrophy associated with blue eye paramyxovirus infection. Proc. of the 11th IPVS Congress. Lausanne, Switzerland, 1990:211.
- 91.- Stephano H., A. Blue eye disease. In: Mengeling, W.L. (ed.) Diseases of swine. 7th. Ed. USA; Iowa, State, University, Press:237-241.
- 92.- Stephano H., A. Eficacia de una vacuna inactivada para el control del paramixovirus de ojo azul en lechones inoculados experimentalmente. En: Premio CANIFARMA Industria farmacéutica veterinaria. México, D.F., Vol 1, No.1, 1992:35-45.
- 93.- Sundqvist, A.; Berg, M.; Hernández-Jáuregui, P.; Linnó, T.; and Moreno-López J. Determinación de las proteínas estructurales del paramixovirus porcino (LPMV). Mem. Reunión Nacional de Investigación pecuaria en México. México, D.F., 1989:82.

- 94.- Sundqvist, A.; Berg, M.; Hernández-Jauregui, P.; Linné, T.; and Moreno-López J. The structural proteins of a porcine Paramyxovirus (LPMV). J. Gen. Virol. 1990(71):609-613.
- 95.- Sundqvist, A.; Berg, M.; Moreno-López, J; and Linné, T. The haemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of the porcine paramyxovirus LPMV: comparison with other paramyxoviruses revealed the closest relationship to simian virus 5 and mumps virus. Arch. Virol., 1992(122):331-340.
- 96.- Tehteh, E.; and Goyal, S.M. Antibodies to parainfluenza virus type 3 in Minnesota swine. Br. Vet. J. 1988(144):613-615.
- 97.- Uribe A., J.; Martínez L., A.; Correa G., P. Presencia y título viral del paramixovirus porcino de La Piedad, Michoacán, en tejidos de cerdos infectados naturalmente. Mem. XXIV Congreso Nacional "AMVEC". Morelia, Michoacán, México, 1989:53-55.
- 98.- Vainionpää, R., Marusyk, R., and Salmi, A. The Paramyxoviridae: aspects of molecular structure, pathogenesis, and immunity. Adv. Vir. Res., 1989, (37):211-242.
- 99.- Zamora G., J.; Martínez L., A.; Correa G., P.; Colinas T., A. Estudio preliminar, en cerdos, de 2 vacunas inactivadas experimentales, elaboradas con el paramixovirus porcino de La Piedad, Michoacán Mem. XXV Congreso Nacional "AMVEC 90". Puerto Vallarta, Jalisco, México, 1990:61-64.

#### **HIPOTESIS**

**LA APLICACION DE UNA VACUNA INACTIVADA OLEOSA PREPARADA CON EL PMVP/LPM, ESTIMULA ACS IH Y SN EN LECHONES Y CERDAS. EN LAS CERDAS VACUNADAS EN EL TERCER TERCIO DE LA GESTACION, PROVOCA UNA RESPUESTA DETECTABLE DE ACS QUE SE TRANSFIEREN A SUS LECHONES A TRAVES DEL CALOSTRO Y LOS PROTEGEN DE LA MORBILETALIDAD; CUANDO ESTOS SON MAS SUSCEPTIBLES ANTE EL DESAFIO CON PMVP/LPM VIRULENTO**

#### **OBJETIVO GENERAL**

**ESTABLECER LAS TECNICAS NECESARIAS PARA LA ELABORACION Y EVALUACION DE UNA VACUNA INACTIVADA PARA PREVENIR LA ENFERMEDAD DEL OJO AZUL DE LOS CERDOS, PRODUCIDA POR EL PARAMIXOVIRUS PORCINO.**



## **CAPITULO II**

### **EVALUACION EN LECHONES DE LA INOCUIDAD Y ANTIGENICIDAD DE UNA VACUNA INACTIVADA OLEOSA CONTRA LA ENFERMEDAD DEL OJO AZUL**

## 2.1. RESUMEN

Con el objeto de evaluar la inocuidad y la respuesta inmune humoral a una vacuna oleosa inactivada experimental, preparada con el Paramixovirus Porcino (PMVP) de La Piedad, Michoacán (LPM), para prevenir la Enfermedad del Ojo Azul (EOA) de los cerdos, se vacunaron por vía intramuscular (IM), 5 lechones lactantes; a 2 de sus hermanos, los cuales sirvieron como controles. Únicamente se les aplicó placebo (el adyuvante oleoso mezclado con el medio de cultivo). La vacuna contenía 50% de suspensión viral inactivada con irradiación Gamma y 50% de adyuvante oleoso. Cada lechón recibió 3 dosis, de 4 ml cada una, del inóculo correspondiente; la primera dosis la recibieron a los 16 días de edad (día 0), la segunda a los 26 días (día 10) y la tercera a los 37 días de edad (día 21). Dos días después de la aplicación del inóculo respectivo, en el sitio de inyección, hubo una ligera inflamación que desapareció entre los 10 y 12 días después; también mostraron ligero aumento de temperatura rectal de 40 C a 40.8 C, que duró de 1 a 5 días, entre los días 5 y 10 después de la primera aplicación del placebo y/o vacuna. A los 28 días después de la última aplicación del placebo y/o vacuna (65 días de edad), todos fueron desafiados con  $10^4$ TCID<sub>50</sub>/1 ml del PMVP/LPM, por vía IM. Ninguno de los cerdos controles y vacunados mostraron signos de la EOA. Las pruebas de inhibición de la hemaglutinación (IH) y de seroneutralización (SN) se hicieron con los sueros colectados los días 0, 10, 21, 49, 63, 77, 112 y 140 días del experimento. En los vacunados, los títulos de anticuerpos (Acs) fueron detectados a partir del día 21 después de la primera vacunación (previo a la tercera dosis de vacuna), con títulos promedio (TP) de 1:7 (IH) y de 1:16 (SN); después, se incrementaron y oscilaron entre 1:26 a 1:176 (IH) y de 1:128 a 1:537 (SN). Los controles empezaron a mostrar Acs IH y SN, a los 14 días posdesafío, con un TP de 1:12.5 (IH) y 1:72 (SN); estos títulos aumentaron en los siguientes muestreos y oscilaron entre 1:30 a 1:60 (IH) y de 1:96 a 1:768 (SN). A los 160 días de edad todos los cerdos fueron sacrificados y en el sitio de aplicación de la vacuna y/o el placebo, se observó una coloración pálida de los músculos semitendinosos con algunos abscesos pequeños, de aproximadamente 1 mm de diámetro, los cuales al estudio histopatológico correspondieron a una miositis granulomatosa crónica y en 2 de los cerdos hubo además vasculitis. Con base en estas experiencias, se puede concluir que los lechones que recibieron 3 vacunaciones, muy probablemente mostraron una respuesta inicial de Acs IH y SN entre los días 10 y 21, después de la primera vacunación; y los Acs estuvieron presentes, con buenos títulos, hasta el día 140; y muy probablemente, perduraron por un tiempo mayor. La vacuna mostró buena antigenicidad; en cuanto a su inocuidad, se observó una ligera reacción inflamatoria local en el sitio de aplicación, así como una débil reacción febril transitoria. La primera vacunación estimuló la respuesta inmune humoral y las siguientes vacunaciones y el desafío, actuaron como un refuerzo que continuó estimulando la memoria inmunológica.

## 2.2. INTRODUCCION

Para la prevención de varias enfermedades de origen viral que afectan a los animales domésticos, se utilizan medidas profilácticas como la vacunación; para ello se cuenta con vacunas inactivadas y vivas atenuadas (3).

Algunas vacunas experimentales usadas en Medicina Veterinaria, han sido inactivadas con métodos físicos como la irradiación gamma (7, 16, 42); en el caso de la Peste Bovina, se ha demostrado que la irradiación gamma inactiva el virus sin alterar algunas de sus propiedades biológicas (24).

Desde la aparición de la EOA, se observó que en los cerdos "pepenados", se presentaba junto con otras enfermedades, ocasionando importantes pérdidas económicas (32). El manejo al que están sometidos los cerdos "pepenados", les produce un estrés; se sabe que este disminuye las defensas y que probablemente esto esté relacionado con una alta frecuencia de infecciones (41). Es sabido que, al infectar experimentalmente lechones lactantes susceptibles con el PMVP de La Piedad, Michoacán (LPM) (9, 20), éste les causa depresión linfoide en el bazo (20) y tonsilitis moderada (36); probablemente esto también ocurra en cerdos recién destetados o de mayor edad (33); aunque aparentemente los cerdos mayores de 20 días de edad, que no son sometidos a un manejo intenso como los cerdos "pepenados", son menos susceptibles al cuadro clínico agudo que ocasiona la EOA en los lactantes de 1 (21, 36) 3 (13) y 7 días de edad (9, 20).

Para tratar de prevenir la EOA, a la fecha se ha informado sobre el uso experimental de algunas vacunas inactivadas con sustancias químicas (8, 11, 12, 34).

Con relación al PMVP/LPM, aislado en 1984 (6, 17, 19), en el CENID-M, INIFAP, SAGAR, inicialmente se elaboraron y probaron 2 tipos de vacunas experimentales contra la EOA, inactivadas con irradiación gamma; una de ellas contenía un adyuvante oleoso y en la otra se empleó gel de hidróxido de aluminio. Al comparar la antigenicidad de ambas, en cerdos de diferentes edades, se demostró que la vacuna oleosa estimuló mejores títulos de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación (IH) y seroneutralizantes (SN) que la vacuna preparada con gel de hidróxido de aluminio (18, 43). Se sabe que se han utilizado algunas vacunas experimentales en la prevención de la EOA en los cerdos "pepenados", y aparentemente se ha notado que la frecuencia del cuadro patológico relacionado con la EOA, no se presenta, o es muy ligero, en los cerdos vacunados con tales vacunas; sin embargo, estas observaciones se han hecho en condiciones de campo ante un desafío natural (11, 12).

### 2.3. OBJETIVOS PARTICULARES.

- a) Evaluar la antigenicidad de una vacuna inactivada oleosa contra la EOA, midiendo la respuesta de anticuerpos IH y SN.
- b) Estudiar el comportamiento de los títulos de anticuerpos IH y SN durante los primeros 5 meses de vida de los cerdos vacunados.
- c) Evaluar el efecto en los títulos de anticuerpos, al desafío con el PMVP/LPM, aplicado por vía intramuscular, a lechones sin vacunar, y en vacunados contra la EOA.

## 2.4. MATERIAL Y METODOS.

### 2.4.1. VIRUS PARA LA PRODUCCION DE LA VACUNA Y PARA EL DESAFIO DE LOS LECHONES.

#### 2.4.1.1. FUENTE DE VIRUS PARA ELABORAR LOTES DE VACUNAS Y PARA EL DESAFIO.

A partir del sexto pase del PMVP/LPM, originalmente aislado en 1984 (17), se preparó un lote del pase 7 en células Pk-15 (los primeros 5 pases se hicieron en células CB); este lote sirvió como fuente de suministro, para elaborar lotes de virus que fueron empleados en los experimentos descritos aquí y en los capítulos III y IV de esta tesis. Brevemente se mencionará que en cada pase del PMVP/LPM, las células infectadas (que siempre fueron inoculadas con el espécimen diluido 1:10) fueron mantenidas a 37 C en una incubadora por un periodo de 6 a 7 días; cuando los monoestratos infectados ya mostraban efecto citopático del 80 al 100 %, se congelaron a -70 C y posteriormente, a los 7-15 días, se preparaban alícuotas, para lo cual se descongelan a temperatura ambiente (aproximadamente a 21 C), nuevamente se congelan a -70 C y se vuelven a descongelar a temperatura ambiente; enseguida los fluidos se centrifugan a 1,800 xg, durante 30 min a 4 C. Los sobrenadantes colectados se mezclan y se reparten en alícuotas de 1.8 ml, que se congelan simultáneamente a -70 C, en un recipiente con hielo seco y alcohol; una vez congeladas, las alícuotas se guardan en nitrógeno líquido (N<sub>2</sub>) o a -70 C, hasta su uso.

#### 2.4.1.2. LOTE DE VIRUS PARA LA ELABORACION DE VACUNA

Para el trabajo que aquí se comunica, se recibió una ampolleta del PMVP/LPM en pase 7, del lote mencionado (17). Al virus contenido en la ampolleta mencionada, se le dieron dos pases adicionales en células Pk-15 para obtener un lote del pase 9, utilizado en la elaboración del lote vacunal del experimento aquí descrito. El procedimiento seguido para la infección de los cultivos celulares se hizo de acuerdo a lo descrito con anterioridad (5). Para realizar el octavo pase al lote mencionado, se infectó, con virus diluido 1:10, un monoestrato de células Pk-15 contenido en una botella de dilución de leche (20 ml); a partir de este pase se realizó el siguiente, para obtener una mayor cantidad de suspensión viral. Los sobrenadantes colectados, del pase 9, se mezclaron y se repartieron en alícuotas de 50 ml, y de 1 ml, y fueron congeladas a -70 C, de acuerdo al procedimiento mencionado; veintiún días después se descongeló una alícuota de 50 ml para preparar la vacuna y otra de 1.8 ml para ser titulada.

#### 2.4.1.3. LOTE DE VIRUS DE DESAFIO.

También se preparó un lote del doceavo pase del PMV/LPM, a partir del noveno pase ya referido, para ser utilizado como virus de desafío; el procedimiento para su elaboración fue similar al mencionado en el párrafo del lote de suministro de virus, excepto que todo el lote se repartió en alícuotas de 1.8 ml y se congelaron a -70 C hasta que fueron usadas; una semana previo a su uso, se descongeló una alícuota para ser titulada.

#### 2.4.2. TITULACION VIRAL CON BASE EN EL EFECTO CITOPATICO (ECP) Y POR LA PRUEBA DE HEMAGLUTINACION (HA).

El lote del noveno pase, empleado para la elaboración de la vacuna, tenía un título por ECP de  $10^{9.5}$  DICC<sub>50%</sub>/ml; y ante la prueba de HA mostró un título de 32 Unidades HA/0.05 ml. Para la titulación del lote del PMVP/LPM, se utilizó el procedimiento ya descrito (5, 25); y que brevemente se describe en el Capítulo III de esta tesis.

#### 2.4.3. ELABORACION DE LA VACUNA Y EL PLACEBO.

##### 2.4.3.1. INACTIVACION DEL PMVP/LPM.

Se extrajeron del congelador dos alícuotas de 50 ml, que habían permanecido congeladas a -70 C, y se enviaron en refrigeración dentro de un recipiente termoaislante a la fuente de rayos gamma, para ser irradiados con una dosificación que varió entre 2.0 y 2.5 Megarads. Veinticuatro horas después, las muestras fueron recogidas, ya irradiadas, y antes de ser congeladas nuevamente a -70 C, se separaron alícuotas de 1 ml, que también se congelaron a -70 C. Posteriormente, las muestras se fueron descongelando conforme se iban usando. Las alícuotas de 1 ml se utilizaron para verificar la inactivación viral, mediante pases en células PK-15 y para titular por HA la suspensión del PMVP/LPM, después de haber sido irradiado.

La suspensión viral, después de haber sido irradiada, mostró un título HA de 1:32. Para comprobar que la suspensión viral había sido inactivada efectivamente, se descongeló una de las alícuotas de 1 ml y se le dieron tres pases en monoestratos de células PK-15, contenidos en 2 tubos de Leighton (TL) (se inocularon 0.2 ml por cada TL); en cada pase, los monoestratos celulares fueron observados diariamente durante un periodo de 8 días, al término del cual se congelaron a -70 C y se descongelaron a temperatura ambiente 2 veces; la suspensión obtenida de la segunda descongelación, fue sometida a una prueba de HA y también se separó una alícuota que fue centrifugada a 1000 xg.

cuyo sobrenadante se utilizó para realizar el siguiente pase seriado. En ninguno de los tres pases se observó algún tipo de daño o de ECP en los monoestratos celulares inoculados; y las suspensiones del sobrenadante de cada pase fueron negativas a la prueba de HA.

#### 2.4.3.2. PREPARACION DE LA VACUNA Y EL PLACEBO.

Para preparar el lote de vacuna, se descongeló una alícuota de 50 ml del PMVP/LPM inactivado; y de acuerdo al procedimiento ya descrito (2), los componentes de la vacuna se mezclaron dentro de una campana de flujo laminar. La vacuna, tenía una composición de 50% de suspensión viral y 50% de aceite mineral más un emulsificante. El placebo también se preparó de acuerdo al procedimiento empleado en la elaboración de la vacuna (2); y estaba compuesto por 50 % de los cultivos de células PK-15 lisadas y 50 % del adyuvante (aceite mineral más el emulsificante).

#### 2.4.4. VACUNACION DE LOS CERDOS.

Se emplearon 7 lechones lactantes, hermanos de 16 días de edad, provenientes de una cerda "libre de patógenos específicos (SPF)" de la granja porcina de CENID-M del INIFAP, SAGAR (1). La cerda y sus lechones no tenían antecedentes de la EOA y serológicamente fueron negativas a la presencia de anticuerpos contra el PMVP/LPM. Con los 7 lechones, se hicieron 2 grupos, seleccionados al azar: el Grupo No. 1 de 5 lechones y el Grupo No. 2 de 2 lechones. A cada lechón del Grupo No. 1, se le aplicaron 3 dosis de 4 ml de la vacuna, por vía IM en el área de los jamones, a los 16, 26 y 37 días de edad (días 0, 10 y 21 del experimento). A cada uno de los 2 lechones controles del Grupo No. 2, se le aplicaron 3 dosis de 4 ml de placebo por la misma vía utilizada en los lechones vacunados; cada dosis de 4 ml de vacuna y/o placebo se aplicó en cantidades de 1 ml en 4 puntos diferentes del jamón, del lechón correspondiente.

#### 2.4.5. DESAFIO DE LOS CERDOS VACUNADOS Y DE LOS CONTROLES.

Todos los cerdos de ambos grupos, fueron desafiados a los 28 días después de la tercera aplicación de la vacuna y/o placebo (día 49 del experimento), cuando tenían 65 días de edad. Cada cerdo fue desafiado por vía IM, en el área de los jamones, con 1 ml de una suspensión viral que contenía  $10^4$  DICC<sub>50%</sub> del virus de desafío.

#### 2.4.6. SEGUIMIENTO DEL COMPORTAMIENTO CLINICO DE LOS CERDOS DESPUES DE LA VACUNACION Y DEL DESAFIO.

A todos los lechones, se les registraron diariamente las temperaturas rectales durante: los primeros 10 días posteriores a la primera vacunación, los primeros 6 días posteriores a la segunda vacunación, y desde los 4 días antes y 18 días después del desafío.

A partir de la primera aplicación de la vacuna y/o el placebo, y hasta los 20 días posteriores al desafío, se les registró diariamente la signología clínica; especialmente se examinó el área de aplicación de la vacuna y/o el placebo.

Cuando los cerdos tenían 160 días de edad (123 días después de la tercera aplicación de la vacuna y/o el placebo), fueron sacrificados para evaluar macroscópicamente el sitio de aplicación de la vacuna en los jamones; de los cuales se tomaron muestras, que fueron fijadas en formalina bufferada (al 10 %) y después incluidas en parafina, cortadas y teñidas con hematoxilina-eosina, para realizar la histopatología.

#### 2.4.7. SEGUIMIENTO SEROLOGICO.

Los cerdos de ambos grupos fueron muestreados para la obtención de suero sanguíneo poco antes de las aplicaciones de la vacuna y/o el placebo; los días 0, 10 y 21, y a los días 49, 63, 77, 97, 112 y 140, posteriores al inicio del experimento. A todas estas muestras de suero se les hicieron las pruebas de IH y SN.

#### 2.4.8. PRUEBAS SEROLOGICAS.

##### 2.4.8.1. PRUEBA DE INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION.

La prueba de IH se hizo de acuerdo al procedimiento de microtitulación ya descrito (25) y brevemente se mencionará que 0.2 ml, de cada suero fueron depositadas en un tubo de ensaye; luego se inactivaron a 56 C en un baño de María durante 30 min; después se agregaron 25 mg de caolín<sup>a</sup> en polvo, lavado y quemado, 0.1 ml de paquete celular de eritrocitos de pollo y 0.8 ml de solución amortiguadora de fosfatos de pH 7.2, esta solución se mezcló continuamente durante un período mínimo de 1.5 h, en un aparato de rotación<sup>b</sup>. Después los eritrocitos y el caolín fueron separados, centrifugando a 1400 rpm, durante 10 min, a 4 C. El suero problema fue decantado, y utilizando una

<sup>a</sup> J.T. Baker, Cat. No. 2240; <sup>b</sup> Thomas rotaling apparatus.



microplaca<sup>1</sup> de plástico de 96 pocitos de fondo redondeado se depositaron 0.025 ml de suero en los 2 primeros pocitos (esta se consideró la dilución 1:5 y fue la mínima que se incluyó en la prueba), en los 2 segundos pocitos y en los 2 últimos pocitos, de las dos primeras columnas de 8 pocitos. En todos los pocitos de la placa, excepto en los del renglón A, previamente se depositaron 0.025 ml de solución salina (SS) de pH 6.8 a 7.0. Con microdilutores de 0.025 ml<sup>2</sup> se hicieron diluciones dobles a partir de los 2 segundos pocitos, hasta los pocitos del renglón G de la microplaca; dejándose como controles del suero los 2 últimos pocitos del renglón H, por lo cual el esquema de diluciones empleado fue de 1:5 hasta 1:320. Enseguida se agregó 0.025 ml de una suspensión del PMVP/LPM, que contenía de 4 a 8 unidades hemaglutinantes, a todos los pocitos, excepto a los 2 controles del suero. Se dejó que esta mezcla reaccionara a temperatura ambiente durante 1 h y enseguida se agregaron 0.050 ml de una suspensión de eritrocitos de pollo al 0.5 %; nuevamente se permitió la reacción por 30-40 min, y enseguida se hizo la lectura. El título de anticuerpos IH del suero correspondió a la máxima dilución, en la cual se inhibió completamente la hemaglutinación.

#### 2.4.8.2. PRUEBA DE SERONEUTRALIZACION.

Esta prueba se hizo de acuerdo al procedimiento ya descrito (25), bajo el sistema de microtitulación, empleando microplacas de fondo plano de poliestireno de 96 pocitos<sup>3</sup>, monocapas de células PK-15, el suero problema fue diluido desde 1:2 hasta 1:4096, se utilizaron 200 DICC<sub>50%</sub> del PMVP/LPM y un período de incubación que varió de 5 a 7 días, a 37 C, en una incubadora humidificada con CO<sub>2</sub> al 5 %. La lectura se hizo con base en la presentación del ECP y a la capacidad HA del sobrenadante de cada pocito. El título seroneutralizante del suero problema se determinó de acuerdo a la dilución mayor del suero que neutralizó completamente el ECP del PMVP/LPM, o impidió la replicación viral de éste, al no detectarse la actividad HA; en todas las pruebas de IH y SN, realizadas en los experimentos de esta tesis, siempre se utilizaron sueros controles de referencia: uno positivo y otro negativo.

<sup>1</sup> Thomas Scientific, Cat. No. 3503E10; <sup>2</sup> Dynatech Labs. Inc., Cat. No. 001-010-0912; <sup>3</sup> NUNC, Cat. No. 1 67008.

## 2.5. RESULTADOS.

### 2.5.1. COMPORTAMIENTO DE LAS TEMPERATURAS RECTALES DE LOS CERDOS DESPUES DE LA VACUNACION Y DEL DESAFIO.

Las temperaturas rectales de los cerdos, durante el periodo de observación, estuvieron dentro del rango normal, excepto en los días 5 al 10, después de la primera aplicación de la vacuna y/o el placebo (Cuadro No. 1); en tales días se observó que uno de los 2 lechones controles, mostró temperatura de 40.1 C al día 7 y el otro lechón control manifestó temperaturas de 40.1 a 40.2 durante los días 7, 8 y 9.

De los lechones vacunados, uno (No. 10) mostró temperatura de 40.2 C el día 7; otro lechón (No. 6) mostró temperaturas de 40 y 40.8 C los días 6 y 8; otros 2 lechones (Nos. 4 y 8) mostraron temperaturas de 40 a 40.7 C, durante los días 7, 8 y 9 (excepto un día, en que uno de estos lechones mostró temperatura de 41.1 C); el lechón restante, (No. 5) mostró temperaturas de de 40 a 40.8 C durante los días 5 al 9.

Después del desafío, sólo un cerdo control (No. 9) mostró, al día 4, una temperatura de 40.1 C, por un sólo día.

### 2.5.2. EVALUACION DE LAS AREAS DE APLICACION DE LA VACUNA Y/O EL PLACEBO.

A partir del siguiente día de la aplicación de la vacuna, al palpar el área crural externa (del jamón), en donde se aplicó la vacuna y/o el placebo, se sentían al tacto algunos puntos de inflamación ligera de consistencia dura que a simple vista no se veían; entre los 3 a los 9 días, estas áreas de inflamación ya eran muy notorias y tenían un diámetro aproximado de 1 cm; y al día 11 ya habían disminuido y casi pasaban desapercibidas. Nuevamente, entre el día 3 al día 9, después de la segunda y tercera aplicación de la vacuna y/o el placebo, estas áreas se notaban inflamadas y entre los 11 y 12 días después fueron disminuyendo y ya casi no se percibían (Cuadro No. 2).

Macroscópicamente, en los músculos semitendinosos se observaron áreas de coloración "marmoleada", semejante a la coloración de carne de pescado y en algunos casos se observaron algunos pequeños abscesos de un diámetro aproximado de 1 mm.

El estudio histopatológico de las áreas en donde se aplicó la vacuna y/o el placebo, reveló que todos los cerdos mostraron una reacción inflamatoria, caracterizada por degeneración y necrosis, presencia de tejido conectivo fibroso, esteatosis, granulomas encapsulados caracterizados por acumulación de macrófagos y células plasmáticas, infiltración linfocitaria con algunos macrófagos y células plasmáticas en el endomisio y epimisio, en 2 casos además vasculitis necrótica y granulomatosa

(reacción de hipersensibilidad de tipo III), y en un caso linfadenitis granulomatosa necrótica y abscedativa.

### 2.5.3. SEGUIMIENTO SEROLOGICO.

Los títulos promedio de anticuerpos IH y SN, se muestran en el Cuadro No. 3 y en la Gráfica No. 1, en donde se puede observar que en los días 0 y 10, cuando se aplicaron la primera y segunda dosis de la vacuna y/o el placebo, los lechones de ambos grupos (vacunados y controles) fueron negativos a las 2 pruebas serológicas empleadas. En los muestreos realizados a partir de la tercera vacunación (día 21), los lechones vacunados empezaron a manifestar la presencia de anticuerpos IH y SN; los títulos promedio más altos de estos anticuerpos (IH de 1:176 y SN de 1:537), se encontraron en el día 63 del experimento (14 días después del desafío); en los siguientes muestreos, los títulos de anticuerpos SN se mantuvieron altos y los IH disminuyeron aproximadamente una o dos diluciones.

En los lechones controles, los anticuerpos IH y SN se encontraron a partir del día 63 del experimento, 14 días después de que fueron desafiados, y el máximo título promedio de anticuerpos SN (1:768) se encontró el día 112 del experimento (63 días después del desafío) y se mantuvo alto en el último muestreo (91 días después del desafío); en cuanto a los anticuerpos IH, los títulos promedio más altos se encontraron en los 2 últimos muestreos (63 y 91 días después del desafío).

## 2.6. DISCUSION.

El comportamiento de las temperaturas rectales estuvieron dentro del rango normal (entre 38.5 y 39.5 C) (14, 37), excepto las ligeras elevaciones de temperatura registradas del día 5 al 10, después de la primera aplicación de la vacuna y/o el placebo; ya que dos lechones (el control No. 9 y el vacunado No. 10) mostraron ligeras hipertermias de 40.1 y 40.2, respectivamente por un solo día; un lechón vacunado (No. 6), también mostró temperaturas de 40 C y 40.8 C por dos días; dos lechones (el vacunado No. 8, y el control No. 7), mostraron temperaturas de 40 C a 40.7 C por 3 días consecutivos; por otra parte, uno de los vacunados (No. 4) mostró fiebre de 40 C a 41.1 C por 3 días consecutivos; y otro de los cerdos vacunados (No. 5), hipertermias de 40 C a 40.8 C por 5 días. En síntesis podemos observar que, hubo una ligera elevación de la temperatura en: 3 cerdos (43 %) por 1 a 2 días, 3 cerdos (43 %) por 3 días (excepto en el cerdo No. 4 que mostró hipertermia franca de 41.1 C por un día), y un cerdo (14 %) por 5 días.

En cuanto a la signología clínica, ningún cerdo de los vacunados ni de los controles, al ser desafiados con el PMVP/LPM a los 65 días de edad, manifestaron signos de la EOA, y esto confirma los hallazgos anteriores en los que se informa que los lechones de 10 (33) 17 (13) y 35 (9) días de edad son menos susceptibles a la EOA, que los de 1 día (21, 36), 3 días (13) y 7 días de edad (9); por ello, los cerdos en crecimiento y en engorda casi no muestran signos ante las inoculaciones experimentales con el Paramixovirus Porcino (9, 33); aunque otros factores que probablemente pudieron haber influido, para que no enfermaran los cerdos controles, fueron la dosis baja de virus y la vía de aplicación. Estos hallazgos vuelven a confirmar que la EOA es una enfermedad más propia de cerdas gestantes y verracos (4, 33, 35), y de lechones lactantes (9, 13, 21, 36); cuyos tejidos del tracto respiratorio y nervioso, aparentemente son ricos en el receptor específico para el PMVP/LPM (23).

En cuanto a las lesiones observadas en el área de aplicación de la vacuna y/o el placebo, como era de esperarse para los adyuvantes minerales de tipo oleoso (38, 39, 40), el daño que ocasionó en todos los cerdos fue una reacción inflamatoria crónica de tipo granulomatosa y además de vasculitis en 2 casos. Esto coincide con los datos encontrados por otros autores, quienes aplicaron una dosis de 2 ml de una bacterina oleosa contra *Haemophilus pleuropneumoniae* y en el sitio de inyección encontraron lesiones similares a las observadas en este trabajo, a los 56 días después de haber aplicado la bacterina (38). En este trabajo, tales lesiones estuvieron presentes a los 123 días después de la aplicación de la tercera dosis; y probablemente la severidad y persistencia de las lesiones observadas, se deban al mayor volumen (4 ml) y al mayor número de dosis (3 dosis) de vacuna, que fue aplicada en el sitio de la inyección, al ser comparada con la dosis utilizada por Straw y cols (1985). La desaparición de los granulomas depende de la especie animal y así por ejemplo en

los bovinos vacunados con una vacuna oleosa contra la Fiebre Aftosa, la inflamación que se observa en unos cuantos animales, desaparece por completo en los primeros meses siguientes a la aplicación subcutánea y se regenera, quedando un pequeño nódulo endurecido (2, 39). En el caso de las aves que manifiestan este tipo de alteraciones, la desaparición de los granulomas ocurre en 3-4 semanas después de ser vacunadas con vacuna emulsionada con alta concentración de antígenos (40), mientras que en el presente trabajo, esto ocurrió parcialmente a los 160 días de edad (123 días después de la tercera dosis de vacuna), cuando todavía se encontraron pequeños granulomas de 1 mm de diámetro, con presencia de macrófagos y de células plasmáticas. Además, en el presente trabajo se observó, en dos jamones, una vasculitis causada por una reacción de hipersensibilidad del Tipo III; en el caso de las aves, éstas lesiones desaparecen en 3-4 semanas (40). Lo anterior sugiere que en un futuro, será necesario estudiar la respuesta inmune con un menor número de dosis y de volumen de vacuna, así como la aplicación en la tabla del cuello; ya que esta región muscular tiene menos valor comercial que el jamón y aparentemente la reacción inflamatoria ante la inyección de vacunas oleosas es menor en el músculo del cuello que en el jamón (38). No obstante las reacciones adversas locales, la vacuna inactivada oleosa estimuló una buena respuesta inmune.

Al comparar los títulos promedio de anticuerpos IH, entre los cerdos vacunados y los controles, observamos que en el muestreo del día 63 (14 días después del desafío), los vacunados tuvieron un título promedio de casi 4 diluciones más alto que los controles; en los siguientes 2 muestreos los vacunados siguieron mostrando un título de casi una dilución más alta que los controles; ya en los últimos 2 muestreos (hechos a los 63 y 91 días posdesafío) los controles tuvieron los títulos de casi una dilución más alta que los vacunados; de acuerdo con estos resultados, el desafío actuó como un refuerzo antigénico en los vacunados por lo que la respuesta de anticuerpos IH, como era de esperarse, aumentó a más del doble, y como ya se mencionó, en relación a los controles hubo una diferencia de casi 4 diluciones; en los demás muestreos, hubo alrededor de 1 dilución entre ambos grupos y por lo tanto hubo poca diferencia ya que esto no es significativo, pues en las pruebas de IH para el diagnóstico de coronavirus bovino (30), parvovirus bovino (31), parvovirus porcino (28) e influenza porcina (29), se acepta que los títulos de los sueros positivos varíen más o menos 2 diluciones. Los títulos de anticuerpos SN, en general se mantuvieron más altos que los de IH. En los cerdos vacunados, el título promedio de anticuerpos SN se incrementó 2 diluciones arriba en el muestreo hecho el día 63 (14 días después del desafío), con respecto al muestreo previo, hecho el día 49 (día del desafío); esto igualmente sugiere que el desafío actuó como un refuerzo. Al comparar los títulos de anticuerpos SN de los controles con los vacunados, se observa que hubo una diferencia de casi 3 diluciones más a favor de los vacunados, en el muestreo hecho el día 63. En el siguiente muestreo, hecho el día 77, los vacunados siguieron mostrando un título SN promedio mayor que fue de alrededor de 2 diluciones. En los siguientes 3 muestreos, la diferencia entre vacunados y controles

fue mínima ya que no fueron ni siquiera de una dilución. Respecto a la respuesta inmune estimulada por las vacunas oleosas contra la Fiebre Aftosa, preparadas con virus previamente inactivado con sustancias químicas, se sabe que estas son mejores que las que utilizan como adyuvante el hidróxido de aluminio, ya que estimulan títulos de anticuerpos más altos y duraderos en los bovinos (2, 39).

En cuanto a la vía de aplicación de otras vacunas inactivadas oleosas (10) y de antígenos en emulsión oleosa (26), se sabe que la ruta de aplicación IM es mejor que la subcutánea (10, 26). Se ha demostrado que la irradiación gamma inactiva efectivamente al Paramixovirus de la Peste Bovina sin afectar algunas de sus propiedades biológicas (24); y que también inactiva al Rabdovirus de la Rabia, sin afectar su capacidad antigénica (42); aunque en este último caso la dosis de irradiación ha sido menor que la empleada en el presente trabajo para inactivar al PMVP/LPM. La dosis empleada en los experimentos de esta tesis, para irradiar al PMVP/LPM, permitió que éste siguiera mostrando su capacidad HA, después de ser irradiado, y que conservara sus propiedades antigénicas después de haber incorporado dicho antígeno a la vacuna oleosa. Otros autores han encontrado que la inactivación con etilénimine o con  $\beta$ -propiolactona no afectan la capacidad HA ni antigénica del Paramixovirus de la Parainfluenza-3 de los bovinos (15).

## 2.7. CONCLUSIONES.

Se cuenta con una vacuna contra la EOA, inactivada oleosa, antigénicamente muy prometedora que estimula títulos altos de Acs con una duración mínima de 140 días. Desafortunadamente mostró algunos efectos indeseables en el área de aplicación, lo cual era de esperarse, con base en la literatura consultada.

Por otro lado, el desafío con el PMVP/LPM actuó como un refuerzo en los vacunados; mientras que los controles, que no enfermaron, respondieron rápidamente con títulos altos de Acs.

ANEXOS 2

Cuadro No. 1.- Días en los que los lechones controles y los vacunados mostraron una alteración en su temperatura rectal, después de la primera aplicación de placebo y/o vacuna vs. la EOA.

DIAS PV*						
No. LECHON	5	6	7	8	9	10
7 <sup>a</sup>	39	38.5	40.2	40.2	40.1	39.6
9 <sup>a</sup>	39.1	39.9	39.3	40.1	39.8	39.9
TEMP. PROMEDIO	39.05	39.2	39.75	40.15	39.95	39.75
10 <sup>b</sup>	39.2	39.3	40.2	39.8	39	39.8
5 <sup>b</sup>	40.2	40	40.8	40.4	40.2	39.5
8 <sup>b</sup>	39.7	39.1	40.2	40.7	40.3	39.4
6 <sup>b</sup>	39.1	40	39.9	40.8	39.9	39.2
4 <sup>b</sup>	39	39.9	40.1	41.1	40	39.7
TEMP. PROMEDIO	39.44	39.66	40.24	40.36	39.88	39.52

\* PV = posvacunación; <sup>a</sup> Lechones controles; <sup>b</sup> Lechones vacunados.



Cuadro No. 2.- Efecto de la vacuna y/o del placebo en el área de su aplicación en los lechones controles y vacunados.

APLICACION DE VACUNA Y/O PLACEBO	INFLAMACION LIGERA* (DIAS**)	INFLAMACION SEVERA (DIAS)
1a.	1 - 2	3 - 9
2a.	1 - 2	3 - 9
3a.	1 - 2	3 - 9

\* Inflamación ligera que a simple vista no se notaba, pero que al palpar el área inyectada se sentían partes inflamadas y duras; Inflamación severa que se veía a simple vista y que entre los días 11 y 12 ya no se observaba.

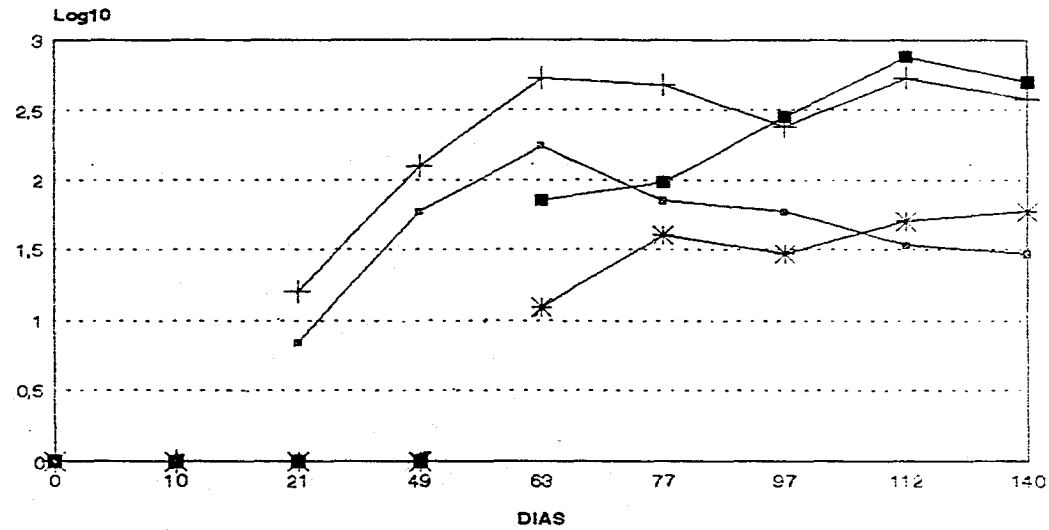
\*\* Días después de la aplicación del biológico respectivo.

Cuadro No. 3.- Respuesta de títulos promedio de anticuerpos IH y SN durante un período de 140 días en lechones vacunados y desafiados, y controles desafiados, con el PMVP/LPM.

MUESTREOS	VACUNADOS		TESTIGOS	
	IH	SN	IH	SN
1a. VAC				
DIA 0	(-)	(-)	(-)	(-)
2a. VAC				
DIA 10	(-)	(-)	(-)	(-)
3a. VAC.				
DIA 21	1:7	1:16	(-)	(-)
DESAFIO				
DIA 49	1:60	1:128	(-)	(-)
DIA 63	1:176	1:537	1:12.5	1:72
DIA 77	1:72	1:486	1:40	1:96
DIA 97	1:60	1:243	1:30	1:288
DIA 112	1:34	1:537	1:50	1:768
DIA 140	1:26	1:384	1:60	1:512

**Gráfica No. 1.- Perfil de Acs promedio IH y SN en 5 lechones vacunados (y desafiados) c/vac PMVP oleosa y en 2 lechones desafiados c/PMVP (Martínez, 1996).**

56



○ IH-VAC + SN-VAC \* IH-TEST ■ SN-TEST

Días 0,10 y 21, aplicación de 4 ml de vacuna y/o placebo.  
 Día 49, desafío con E+4 TCiD 50 a todos.

## 2.8. LITERATURA CITADA.

- 1.- Anónimo. Formación de una granja experimental de cerdos libres de patógenos específicos (SPF) para estudios relacionados con la enfermedad de aujeszky y enfermedades respiratorias del cerdo. En: AMVEC (eds.) Porcrama. 1990, vol XIII(160):28-30.
- 2.- Barei, S.; Panina, G.F.; Orfei, Z.; Nardelli, L.; and Castelli, S. Comparison of the potency for cattle of trivalent FMD vaccines adjuvanted by aluminum hidroxide-saponin or oil emulsion. Zbl. Vet. Med. B. 1978(26)454-460.
- 3.- Barteling, S. J. and Vreeswijk, J. Developments in foot-and-mouth disease vaccines. Vaccine. 1991;(9) 75.
- 4.- Campos H., R y Carbajal S., M., 1992. Trastornos reproductivos en los sementales de una granja porcina de ciclo completo ante un brote de ojo azul. En: Morilla G., A (ed.) Avances en Producción Porcina. México. 1:243-250.
- 5.- Colinas T., A. Curva de multiplicación del Paramyxovirus porcino LPM en la línea celular Pk-15, con base en el título viral, determinado por hemaglutinación y por efecto citopático. Tesis Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 1989:78.
- 6.- Correa-Girón, P.; Martínez L., A.; Ericsson, A.; and Moreno-López, J. Characterization of a paramyxovirus isolated from the brain of a piglet in Mexico. In: Procc. of The 9th IPVS Congress. Barcelona, Spain, 1986:205.
- 7.- Figueroa, J. V.; Ramos, J. A.; Alvarez, J. A.; Cantó, G. J.; Vega, C. A. Desarrollo de una vacuna atenuada contra la besbesiosis bovina. En: Pérez T., J.M. y González P., E. (eds.) XV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias, Acapulco, Méx., octubre 9-15, 1994:389.
- 8.- Fuentes R., J.M. Evaluación de una vacuna experimental contra ojo azul en cerdos mediante las pruebas de inmunogenicidad inoculada potencia y medición de la inmunidad pasiva en lechones. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 1993:30.

- 9.- Galina P., L.; Martínez L., A.; Correa G., P.; Colinas T., A.; Anaya E., A. M.; Aguilar R., F.; Ramírez N., R. Transmisión experimental del Paramixovirus Porcino de La Piedad Michoacán (PP-LPM) en cerdos. En Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. México, D.F. 1989:84.
- 10.- Hasebe, H.; Osorio, F. A.; and Hogg, A. Effect of vaccination site on the efficacy of a GpIII deleted MLV Aujeszky's disease vaccine. In: IPVS (ed.) Chap Viral Disease. Procc. I. 12th IPVS Congress, August 17-20, The Hague The Netherlands 1992:67.
- 11.- Hernández-Jáuregui, P.; Sundqvist, A.; Fuentes, M.; Díaz O., A.; Reyes L., J.; Hernández B., E.; Moreno-López, J. Correlación entre las pruebas de virus neutralización, inhibición de la hemoaglutinación y ELISA en sueros vacunales y de brote para anticuerpos contra el paramixovirus del síndrome del ojo azul en cerdos. Vet. Méx., 1992(XXIII):217-222.
- 12.- Iglesias, G.; Rincón R., F.; Vásquez, B.; Tapia, J.; Domínguez F. Evaluación de una vacuna para la prevención de la enfermedad causada por el paramixovirus porcino. In: First International Symposium Upon Pig Paramyxovirus. Puebla, México, 1994:43-44.
- 13.- Kennedy, S.; Carroll, B.; McConnell, S.; Herron, B.; McNeilly, F.; Allan, G.; Walker, I.; Adair, B.; Hernández-Jáuregui, P.; and Linne T. Experimental LPM paramyxovirus infection in pig: histological and immunohistochemical findings. In: First International Symposium Upon Pig Paramyxovirus. Puebla, México, 1994:51.
- 14.- Kolb, E. La regulación térmica. En: Kolb, E. (ed.). Fisiología veterinaria (II). 2ª. ed. España; Acribia:728.
- 15.- Köves, B.; Belák, S.; and Rusvai, M. Comparative studies on haemagglutinating activity and immunogenicity of bovine parainfluenza-3 virus strain. Acta Vet. Acad. Scien. Hung. 1982, vol. 30(1-3):45-50.
- 16.- López A., M.E.; Cantó A., G.J.; Liebano H., E.; Millán S., F.; y Vázquez P., V. Producción y evaluación de una vacuna viva irradiada contra Dictyocaulus viviparus. En Mem. Reunión Nal. de Invest. Pec. Jalisco 1993:263.

- 17.- Martínez L., A.; Correa G., P.; Fajardo M., R.; Garibay S., M. Aislamiento y estudio de un virus porcino parecido a los paramixovirus. En Correa G P, Morilla G A (eds.) Encuentro sobre enfermedades infecciosas del cerdo. México, D.F. 1985:15-21.
- 18.- Martínez L., A.; Correa G., P.; Coba A., M.A.; Zamora G., J. Advances in the evaluation of a experimental vaccine against porcine Paramixovirus (PPMV). In: First International Symposium upon Pig Paramyxovirus. Puebla, Méx. 1994:41.
- 19.- Moreno-López, J.; Correa-Girón, P.; Martínez L., A. y Ericsson, A.. 1988. Characterization of a Paramixovirus isolated from the brain of a piglet in Mexico. Arch Virol 91:221-231.
- 20.- Pallares C., R.; Fajardo M., R.; Martínez L., A.; Correa-Girón, P.; Coba A., M.A.; Zamora E, J.L. Alteraciones histológicas en lechones inoculados con diferentes dosis del paramixovirus porcino (PMVP). En: Martínez P., R (ed) Mem. Reunión Nal. de Invest. Pec. en Méx. México, D.F. Vet. Méx. Supl. 1995, 95(26):122.
- 21.- Pérez P., F.; Stephano H., A.; Gay G., M. Estudio histológico en lechones inoculados experimentalmente con el paramixovirus de ojo azul. En: Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos (eds.). XXIII Congreso Anual AMVEC, León, Gto., México, 1988:81-83.
- 22.- Ramírez N., R.; Martínez L., A.; Correa G., P.; Colinas T., A. Un brote de paramixovirosis encefalítica en cerdos de una granja del estado de México. En: Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos (eds.). II Congreso ALVEC, XII Convención AMVEC y III Encuentro UNPC, Acapulco, Gro., México, 1987:64-67.
- 23.- Reyes-Leyva, J.; Hernández-Jáuregui, P.; Montaña F., L.; and Zenteno, E. The porcine paramyxovirus LPM specifically recognizes sialyl (alfa 2,3) lactose-containing structures. Arch. Virol. (1993) 133:195-200.
- 24.- Saliki, J.; Berniger, M. L.; Torres, A.; House, J. A.; Mebus, C. A.; Dubovi, E. J. Effect of gamma irradiation on reactivity of rinderpest virus antigen with bovine immune serum in enzyme-linked immunosorbent assays and virusneutralization and indirect fluorescent-antibody tests. Journal Clinical Microbiology 1993(31)2:428-432

- 25.- Sánchez B., R.; Ramírez C., P. Estudio seroepidemiológico del Paramixovirus Porcino de La Piedad Michoacán (Pp-LPM) en el Estado de Tlaxcala. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Tlaxcala, México. 1994:70.
- 26.- Schultz, Z.; Bäckström, L.; and Schultz, R. Antibody response of pig to antigens administered intramuscularly or in the subcutanea lat. In : IPVS (ed.) Procc. International Pig Veterinary Society 10th Congress. August 14-17. Rio de Janeiro Brazil. 1988:27.
- 27.- Snyder, M. L.; Stewart, W.C.; and Kresse, J.I. Microtitration neutralization test for pseudorabies and transmissible Gastroenteritis viruses. In: Serologic microtitration techniques. USDA, APHIS, VS, NVSL, Ames, Iowa, USA, 1981:44- 48.
- 28.- Snyder, M. L.; Eernisse, K. A.; McKnight, R. A.; and Stewart, W.C. Microtitration hemagglutination inhibition test for porcine parvovirus. In: Serologic microtitration techniques. USDA, APHIS, VS, NVSL, Ames, Iowa, USA, 1981:28-31.
- 29.- Snyder, M. L.; Eernisse, K. A.; Jutting, D.R.; and Middle, L.A. Microtitration hemagglutination inhibition test for swine influenza virus (SIV). In: Serologic microtitration techniques. USDA, APHIS, VS, NVSL, Ames, Iowa, USA, 1981:32-34.
- 30.- Snyder, M. L.; and Kelso, N. E. Microtitration hemagglutination inhibition test for bovine coronavirus (BCV). In: Serologic microtitration techniques. USDA, APHIS, VS, NVSL, Ames, Iowa, USA, 1981:20-23.
- 31.- Snyder, M. L.; and Hegland, M. J. Microtitration hemagglutination inhibition test for bovine parvovirus. In: Serologic microtitration techniques. USDA, APHIS, VS, NVSL, Ames, Iowa, USA, 1981:24-27.
- 32.- Stephano H., A.; Rodríguez, H.; Peralla R., C. Análisis de un brote de angiopatía cerebro espinal (enfermedad del edema) y síndrome del ojo azul en cerdos de una granja engordadora. Mem. II Cong. Nal. AMVEC. Mazatlán, Sinaloa, México, 1984:102-104.
- 33.- Stephano H., A.; Gay G., M. Experimental studies on a new viral syndrome in pigs called "blue eye", characterized by encephalitis and corneal opacity. In: 8th International Pig Veterinary Society Congress, Ghent, Belgium, 1984: chap II:71.

- 34.- Stephano H., A. Eficacia de una vacuna inactivada para el control del paramixovirus de ojo azul en lechones inoculados experimentalmente. En: CANIFARMA (eds.) Industria Farmacéutica Veterinaria; Premio Canifarma, 1991(1):35-45.
- 35.- Stephano H., A.; Hernández, D.; Pérez, C.; González C., T.; Ramírez M., H.; and Cervantes, A. Boar infertility and testicular atrophy associated with blue eye paramyxovirus infection. In: Proc. of The 11th IPVS Congress. Lausanne, Switzerland, 1990:211.
- 36.- Stephano H., A.; Gay G., M.; and Ramírez T., C. Encephalomyelitis, reproductive failure and corneal opacity (blue eye) in pigs, associated with a paramyxovirus infection. Vet. Rec., 1988;122(2):6-10.
- 37.- Straw, B.E.; and Meuten, D.J. Physical examination. In: Leman, A.D.; Straw, B.; Glock, D.R.; Mengeling, W.L.; Penny, R.H.C.; and Scholl, E. (eds.). Diseases of swine, 6th ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA. 1986:202.
- 38.- Straw, B.E., MacLachlan, N.J.; Corbett, W.T.; Carter, P.B.; and Schey, H.M. Comparison of tissue reactions produced by Haemophilus pleuropneumoniae vaccines made with six different adjuvants in swine. Can J Comp Med 1985;49:149-151.
- 39.- Suttmoller, P. The prospect of oil-adjuvanted foot-and-mouth disease vaccine in southamerica. In: Karger, S. and Basel (eds.). International symposium on foot-and-mouth disease. Develop. biol. standard. 1972, vol 30:135-138.
- 40.- Tinoco G., H. Formación de proteínas alostéricas en aves vacunadas con vacunas emulsionadas con alta concentración de antígenos (inmunógenos y proteínas varias). En: UNAM, OIRSA, CANIFARMA, SARH (eds.) Actualización de normas de control de calidad para productos biológicos veterinarios. México 1988.
- 41.- Wallgren, P.; Höjer, K.; Alan, G. Depressed immune function and signs of frequent infections in pigs during the first weeks after transfer to a fattening herd. In ; IPVS (ed.) Procc. International Pig Veterinary Society 10th Congress. August 14-17, Rio de Janeiro Brazil, 1988:24.
- 42.- Weimersheimer R., J.; Loza R., E. Caducidad de la vacuna antirrábica V-319 Acatlán inactivada con radiación gamma (Co-60). En: Mem. Reunión Nal. de Invest. Pec. Jalisco, México 1993:207.



43.- Zamora G., J.; Martínez L., A.; Correa G., P.; Colinas T., A. Estudio preliminar en cerdos de dos vacunas inactivadas experimentales elaboradas con el paramixovirus porcino de La Piedad Michoacán. En: AMVEC (eds.). XXV Congreso Nacional AMVEC. Puerto Vallarta, Jal., México, 1990:61-64.

### CAPITULO III

DETERMINACION DE LA DOSIS DEL PMVP/LPM QUE MATA AL 80-100 %  
DE LECHONES SUSCEPTIBLES.

### 3.1. RESUMEN

Para contar con un lote de Paramixovirus Porcino (PMVP), de La Piedad, Michoacán (LPM), apropiado para el desafío de lechones vacunados contra la EOA, y de sus controles, se realizó un experimento, utilizando un lote del octavo pase del PMVP/LPM, reproducido en células PK-15, con un título de  $10^{7.0}$  TCID<sub>50%</sub>/ml; se utilizaron 10 lechones (5 ♂ y 5 ♀), de 4 y 7 días de edad, agrupados al azar, en 2 grupos de 5 lechones cada uno; los cuales fueron inoculados por aerosoles, dentro de una cámara con 3 nebulizadores que dispersaron el inóculo, con partículas de un diámetro aproximado de 0.5 a 5  $\mu$ : El Grupo A, (con 4 lechones de 7 y 1 de 4 días), recibió los aerosoles virales procedentes de 28 ml X  $10^{7.0}$  TCID<sub>50%</sub>, durante 35 min; el Grupo B, (con 4 de 7 y 1 de 4 días) recibió 27 ml X  $10^{6.9}$  TCID<sub>50%</sub> durante 42 min. Se dejó a un lechón de 7 días como control de contacto, el cual no enfermó y sólo seroconvirtió al día 25 PI. En el Grupo A, se empezaron a observar algunos signos a partir del día 3 PI; los signos nerviosos se observaron desde el día 5 hasta el día 7; al día 7 murieron 2 lechones y al día 8 otros 2. En el Grupo B, los signos se manifestaron del día 3 al 12; los signos nerviosos se presentaron del día 6 al 11; al día 7 murieron 2 lechones y al día 12 uno. Los signos clínicos fueron similares a los observados anteriormente en condiciones controladas y de campo. El virus fue aislado del encéfalo e identificado mediante la prueba de inhibición de la hemaglutinación, utilizando un suero policlonal conocido hiperinmune contra el PMVP/LPM. En los 2 grupos inoculados se observó una morbilidad del 100% y mortalidades del 80% y 60%, para los grupos A y B, respectivamente. En los que sobrevivieron a las inoculaciones, se detectaron anticuerpos a partir del día 10. Lo anterior sugiere que para que un lote del PMVP/LPM muestre una letalidad mínima del 80% y pueda ser usado para evaluar la potencia de las vacunas, debe cumplir con los requisitos antes señalados, en cuanto a título viral, método de desafío y edad de los lechones inoculados.

### 3.2. INTRODUCCION.

Para la prevención de varias enfermedades de origen viral que afectan a los animales domésticos, se utilizan medidas profilácticas como la vacunación; para ello se cuenta con vacunas inactivadas y vivas atenuadas (1). Un requisito fundamental que deben cumplir las vacunas antes de ser liberadas al mercado es el de pasar satisfactoriamente una prueba de potencia (13, 22). Para cumplir con tal requisito, se requiere contar con un virus de desafío que cause una letalidad de por lo menos el 80 % y/o una morbilidad equivalente en los animales susceptibles (13, 22). Recientemente hizo su aparición un nuevo padecimiento de los cerdos denominado Enfermedad del Ojo Azul, ocasionada por un paramixovirus y que únicamente afecta a los cerdos (12 y 19); y a la fecha se ha informado sobre el uso experimental de algunas vacunas inactivadas para tratar de prevenir tal enfermedad (6, 9, 10 y 21). Sin embargo se ha informado que sólo a 2 vacunas se les ha realizado la prueba de potencia en lechones, aunque previamente el virus de desafío no fue titulado en lechones, para conocer la dosis inoculada (6 y 21); y otra vacuna fue probada vacunando ratones (10). En relación al Paramixovirus Porcino (PMVP) de La Piedad, Michoacán (LPM), aislado en 1984 (11 y 12), se ha estudiado en forma preliminar, la inocuidad y antigenicidad de una vacuna experimental (23); sin que pudiera contarse con un virus de desafío adecuado, para ser utilizado en pruebas de potencia; y aunque se logró determinar la edad en que los lechones son susceptibles, así como la dosis aproximada del PMVP/LPM que produce signos clínicos y letalidad (8), se desconoce la dosis más precisa del PMVP/LPM, o de otros aislados del PMVP, que mate por lo menos al 80% de los lechones susceptibles inoculados.

### 3.3. OBJETIVOS.

- 1) Contar con un lote del PMVP/LPM virulento, de referencia, apropiado para ser usado en pruebas de potencia, para evaluar la inmunogenicidad de las vacunas, antes de que sean liberadas al mercado, para prevenir la Enfermedad del Ojo Azul (EOA).
- 2) Titular en lechones lactantes susceptibles un lote del PMVP/LPM, del octavo pase en cultivos celulares de línea continua, para establecer la dosis que mate al 80-100 % de los lechones susceptibles.

### 3.4. MATERIAL Y METODOS.

#### 3.4.1. VIRUS

Se empleó el octavo pase del PMVP/LPM, propagado en cultivos celulares de línea continua; los primeros 5 pases se propagaron en células de cornete de bovino y los posteriores en células de riñón de cerdo Pk/15 (12). El proceso de infección de los cultivos celulares se hizo de acuerdo a lo descrito en otro trabajo (3). Para obtener suficiente suspensión viral del octavo pase, se descongeló una ampollita del pase 7, mencionado en el Capítulo II, y se le dió un pase adicional. El proceso de infección de las células, así como de obtención de las alícuotas (de 1.8 ml) y de su almacenamiento (a -70 C, durante 30 días), se hicieron de acuerdo al procedimiento mencionado en el Capítulo II; El día en que se inocularon a los lechones, se descongelaron las alícuotas correspondientes; diez días antes se descongeló una alícuota para ser titulada por HA y ECP.

##### 3.4.1.1. TITULACION VIRAL CON BASE EN EL EFECTO CITOPATICO PRODUCIDO.

Para la titulación del lote del PMVP/LPM, se utilizó el procedimiento ya descrito (3); el virus a ser titulado se descongeló a temperatura ambiente y una vez descongelado, se hicieron diluciones logarítmicas hasta la dilución  $10^7$ , usando como diluyente medio mínimo esencial (MEM)<sup>2</sup> para cultivos celulares, manteniéndolas siempre en refrigeración, en hielo picado. Una vez realizado lo anterior, se utilizaron microplacas<sup>2</sup> de 96 pocitos de fondo plano para cultivos celulares, en donde se depositaron, con una pipeta multicanal<sup>2</sup> de 12 puntas intercambiables, 0.025 ml de MEM, en todos los pocitos, posteriormente en la primera columna de 8 pocitos se depositaron 0.025 ml, en cada pocito, del virus diluido  $10^1$ , este procedimiento se repitió en las siguientes columnas de pocitos con cada una de las diluciones del virus; los pocitos de las columnas restantes se dejaron como células controles. Enseguida se depositaron aproximadamente  $10^4$  células Pk-15 por pocito. Y las placas se incubaron a 37 C en una incubadora humidificada y con CO<sub>2</sub> al 5 %, por un período de 5 a 7 días; y la lectura del ECP se hizo utilizando un microscopio óptico invertido. La determinación de la DICC<sub>50%</sub> se hizo de acuerdo al método de Karber (18). El lote del octavo pase tenía un título de  $10^{7.9}$  DICC<sub>50%</sub>/ml.

##### 3.4.1.2. TITULACION DEL PMVP/LPM POR LA PRUEBA DE HEMAGLUTINACION (HA).

Para la titulación del PMVP/LPM por medio de la prueba de HA, se utilizó el procedimiento ya descrito (3). Se emplearon microplacas de poliestireno de 96 pocitos, de la marca ya mencionada en la prueba de IH. Para titular cada lote diferente, se utilizaron 4 columnas de 8 pocitos cada una.

Primero se depositaron 0.05 ml de solución salina (SS), enseguida se depositaron con 4 microdilutores calibrados <sup>1</sup>, 0.050 ml del lote de virus que iba a ser titulado, en cada uno de los primeros 4 pocitos de las 4 columnas. Con estos mismos microdilutores se hicieron las siguientes diluciones hasta llegar a los 4 pocitos del renglón G y se retiraron; los 4 pocitos del renglón H sirvieron como controles de eritrocitos, ya que estos no deben autohemaglutinar, pues en algunos casos contienen heterohemaglutininas (2); el esquema de dilución se inició con la dilución 1:2 y terminó con la dilución 1:128. A continuación se depositaron en cada uno de todos los pocitos 0.050 ml de eritrocitos al 0.5 %, de pollo joven, previamente lavados. Se permitió la reacción a temperatura ambiente por aproximadamente 30 min y enseguida se hizo la lectura. El título viral se consideró como la dilución mayor en donde los 4 pocitos mostraron una HA completa.

<sup>1</sup> GIBCO, Cat. No. 410-1500; <sup>2</sup> NUNC, Cat. 1.67008; <sup>3</sup> Coster Cat. No. 4880.  
<sup>4</sup> Dynatech labs, Inc. Cat. No. 001-010-1012.

### 3.4.2. ANIMALES.

#### 3.4.2.1. CERDAS PROVEEDORAS DE LECHONES SUSCEPTIBLES AL PMVP/LPM.

Para la obtención de lechones lactantes susceptibles al PMVP/LPM, se emplearon 2 cerdas gestantes, hermanas, de quinto parto, provenientes de una granja convencional localizada en Ajuchitlán, Qro. En la granja se utilizaban sementales y vientres de las razas Landrace y Duroc. La granja no tenía antecedentes clínicos de la EOA y las cerdas resultaron negativas a anticuerpos IH y SN contra la EOA y el PMVP/LPM; y también fueron seronegativas a la Enfermedad de Aujeszky. Las cerdas, fueron transportadas al CENID-M, en Palo Alto, D.F. y se alojaron en una Unidad de Aislamiento, en corrales individuales de aproximadamente 7.3 m<sup>2</sup> cada una fue acondicionada previamente con un bebedero automático de plato, comederos de canal y barras<sup>5</sup> semiperimetrales separadas del piso y de la pared a una distancia aproximada de 15 cm; para proteger a los lechones. Cinco días previos al parto, los corrales fueron limpiados, desinfectados y acondicionados con viruta limpia y 2 focos de 60 watts; uno de ellos fue puesto en una esquina del corral a 20 cm sobre el nivel de la viruta limpia y a medida que pasaban los días fueron levantados gradualmente a mayor altura, hasta quedar finalmente a una altura de 30 cm. Los focos fundidos fueron reemplazados inmediatamente, de tal manera que los lechones permanecieron con una fuente de calor cercana, durante los primeros 25 días de vida. Y la viruta sucia y mojada fue reemplazada diariamente. A los 2 días después de haber nacido los lechones, a cada uno se le aplicó, por vía IM, 200 mg de hierro elemental, en la forma de complejo de hierro dextrán hidrogenado. Posteriormente los lechones fueron empleados en los experimentos de titulación del PMVP/LPM.

#### 3.4.2.2. LECHONES SUSCEPTIBLES UTILIZADOS EN LA DETERMINACION DE LA DOSIS DEL PMVP/LPM CAPAZ DE MATAR AL 80-100 % DE ELLOS.

Para la determinación de la dosis del PMVP/LPM capaz de matar al 80-100 % de los lechones susceptibles inoculados, se formaron dos grupos de 5 lechones cada uno, con las siguientes características: Grupo A) Cuatro lechones de 7 días y uno de 4 días de edad, que fueron seleccionados al azar, a partir de un grupo de 11 lechones constituido por nueve de 7 días y dos de 4 días de edad, procedentes de las 2 cerdas mencionadas anteriormente; Grupo B) Cuatro lechones de 7 días y uno de 4 días de edad, seleccionados al azar, del grupo de 6 que sobraron al formar el grupo anterior; al lechón restante de 7 días de edad, se le dejó como control de contacto.

<sup>5</sup> Tubo de hierro galvanizado ced. 40, de 2 pulgadas de diámetro.



### 3.4.3. INOCULACION DE LOS LECHONES.

#### 3.4.3.1. INOCULACION DE LOS LECHONES CON AEROSOLES INFECTANTES, DENTRO DE UNA CAMARA DE NEBULIZACION.

Cámara de nebulización.- La inoculación de los lechones dentro de una cámara de nebulización se hizo de acuerdo a un procedimiento ya antes descrito (4), consistente en utilizar una cámara de nebulización semihermética que mide 83.5 cm de alto por 127.5 cm de largo y 119.5 cm de ancho, con un volumen aproximado de 1.272 m<sup>3</sup>. La cámara estaba equipada con 3 nebulizadores que dispersan partículas de aproximadamente 0.5 a 5 µ; los nebulizadores, a su vez, estaban conectados mediante mangueras a una compresora; la presión ejercida a los tres nebulizadores varió de 2 a 2.5 Kg/cm<sup>2</sup>. Los lechones de los grupos A y B fueron introducidos a la cámara de nebulización, para ser inoculados de acuerdo al siguiente procedimiento:

Grupo A) Este grupo recibió, durante 35 min, los aerosoles procedentes de 28 ml de una suspensión viral, del octavo pase del PMVP/LPM, que tenía un título de 10<sup>7.0</sup> DIC<sub>50%</sub>/ml; Grupo B) Este grupo, que fue introducido en primer lugar a la cámara de nebulización, recibió durante 42 min, al igual que el anterior, los aerosoles procedentes de 27 ml, de una suspensión viral del octavo pase del PMVP/LPM, que tenía un título de 10<sup>6.9</sup> DIC<sub>50%</sub>/ml. Una vez terminada la inoculación, los lechones de cada grupo fueron regresados a sus madres y diariamente, durante un periodo de 22 días, se les registró su temperatura rectal, así como la signología clínica. A los lechones que murieron, se les hizo la necropsia y varios de sus tejidos fueron colectados y congelados a -70 C para posteriormente intentar el aislamiento del PMVP/LPM. Al lechón restante, de 7 días de edad, se le dejó como control de contacto y también se le dio un seguimiento clínico, de su temperatura rectal y serológico, en forma similar a los grupos A y B.

#### 3.4.3.2. AISLAMIENTO DEL PMVP/LPM A PARTIR DE LOS TEJIDOS DE LOS LECHONES MUERTOS A CAUSA DE LA INOCULACION CON EL PMVP/LPM.

De las muestras colectadas del encéfalo de 4 lechones muertos después de ser inoculadas con el PMVP/LPM, se hicieron macerados al 20 % utilizando como diluyente MEM, el cual por cada ml contenía 250 unidades de benzilpenicilina sódica cristalina, 250 µg de estreptomicina y 100 unidades de nistatina. Las muestras colectadas fueron de las partes anterior, media y posterior del encéfalo, y del cerebelo, de los lechones Nos. 81 y 84, del Grupo A, y Nos. 77 y 88 del Grupo B; estos 4 lechones murieron el día 7 PI. Los macerados fueron centrifugados a 2500 rpm por 25 min, a 4 C; con los sobrenadantes obtenidos se hicieron alicuotas, que fueron congeladas a -70 C. Posteriormente se

descongeló una alícuota de cada muestra; con una fracción de ella se hizo una prueba de HA y con la otra parte se inocularon los monoestratos de células Pk-15, de dos días de edad, contenidas en 2 tubos de Leighton (TL), depositando 0.2 ml de inóculo en cada monoestrato; previo a la inoculación, se retiró el medio de crecimiento y enseguida se agregó el inóculo y se permitió la adsorción durante una h, a 37 C, moviéndolos suavemente cada 10 min; posteriormente se le agregaron a cada TL 2 ml MEM con 2 % de suero fetal de ternera, previamente irradiado con 2.5 megarads (5); y después los tubos se incubaron a 37 C durante 5 días. Paralelamente se utilizaron 5 TL como controles. Pasado ese período, se colectaron los sobrenadantes de cada TL, con los que también se hicieron alícuotas. Utilizando una de ellas se realizó una prueba preliminar de HA; y otra fue empleada para dar un segundo pase. A este último pase se le hizo una prueba de HA, y después se le utilizó como antígeno en una prueba de IH, ante sueros conocidos de referencia; uno positivo y otro negativo a anticuerpos contra la EOA.

### 3.5. RESULTADOS

#### 3.5.1. PERIODO DE INCUBACION, SIGNOS CLINICOS, CURSO, MORBILIDAD Y MORTALIDAD EN LOS LECHONES INOCULADOS CON EL PMVP/LPM.

##### 3.5.1.1. TITULACION EN LECHONES DE UN LOTE DEL OCTAVO PASE DEL PMVP/LPM.

###### GRUPO A.

El período de incubación fue corto, puesto que se empezaron a observar lagañas en todos a partir del día 3, las cuales persistieron hasta el día 5 PI. Al día 5 PI, de 4 que se mostraban enfermos, en 2 (Nos. 84 y 87), que mostraban buen estado de carnes se empezaron a observar signos nerviosos de incoordinación y debilidad de los miembros posteriores, conjuntivitis, blefaritis y anorexia; en otro (No. 81) hubo incoordinación, tristeza e inactividad, ya que sólo permanecía echado; el cuarto lechón (No. 89) estaba flaco, con blefaritis, tembor general y estornudos. Al día 6 PI, en los 2 previamente afectados con incoordinación y debilidad del tren posterior (Nos. 84 y 87), se observó pelo hirsuto, tembor general, blefaritis y conjuntivitis; en uno (No. 84) se observó opistótonos, postración con posición en decúbito lateral izquierdo y ronquidos; en el otro (No. 87) se observó parálisis del tren posterior, con postración parcial, adoptando una posición anormal de "perro sentado". De los otros 2 (Nos. 89 y 81) que todavía no se postraban, en uno (No. 89) se observó tembor general, y el otro (No. 81) mostró incoordinación, ronquidos y vómito. Al día 7 PI, uno de los más afectados (No. 84), que seguía postrado con tembor generalizado, murió al igual que uno de los menos afectados (No. 81) que antes de morir estaba postrado en decúbito lateral izquierdo, y que al intentar pararse y caminar mostraba incoordinación y debilidad. Otro, de los más afectados (No. 87), estaba agonizante. También otro de los menos afectados (No. 89) del día anterior ya estaba postrado. Al día 8 PI, murieron los 2 lechones restantes (Nos. 81 y 89). A la necropsia, los lechones que murieron presentaron lesiones macroscópicas similares a las comunicadas en otros estudios experimentales y de campo, con respecto a esta enfermedad (16, 17, 19 y 20). El lechón que sólo había mostrado lagañas del tercero al quinto días PI (No. 85), también mostró ligera incoordinación del tren posterior y cabeza agachada al día 11 PI, después se recuperó y no mostró otro signo durante un período de observación de 39 días PI.

En resumen, los signos nerviosos se iniciaron a partir del día 5 PI y se fueron tornando más severos en los siguientes 2 días, hasta la presentación de la muerte. Así, el período de incubación fue de 3 días, con un curso de 4 y 6 días. En este grupo de lechones se observó una morbilidad del 100 % con una mortalidad del 80 % (cuadro 1).

## GRUPO B

Los signos se manifestaron a partir del día 3 y duraron hasta el día 12; del 3 al 5 en todos se observaron lagañas y en 2 se observaron exudado nasal y estornudos. Al día 6 PI en 2 lechones (Nos. 83 y 88), que estaban en buen estado de carnes, se observó incoordinación y en uno (No. 77), también en buen estado de carnes, que fue encontrado postrado en posición de decúbito lateral izquierdo, se observó además pelo hirsuto, mirada fija, parálisis del tren posterior, tremor en la mitad anterior del cuerpo y espasmos. Al día 7 PI, el lechón No. 77 fue encontrado muerto y el No. 88, que el día anterior sólo había mostrado incoordinación, estaba agónico y murió en el transcurso de ese mismo día; otro de los lechones (No. 79), empezó a mostrar incoordinación y estornudos. Al día 8 PI, el lechón No. 79, se notaba clínicamente mejor; otro de los lechones (No. 82) se encontró triste y con incoordinación; Y el No. 83, mostró ceguera, incoordinación, pica, afonía, blefaritis, conjuntivitis, exudado nasal y constipación, con heces de color marrón; del día 9 al 11, mostró además pelo hirsuto, tremor general, caminata en círculos hacia el lado izquierdo, apoyaba la trompa para caminar, debilidad general, nariz seca, constipación, cabeza agachada, respiración "abdominal", espasmos y para el día 10 PI permanecía por más tiempo postrado y la condición física bastante disminuida (emaciado), posiciones anormales, piel sucia, cianosis en región ventral, perioral y orejas y tics nerviosos; para el día 12 PI, se encontró muerto. Los lechones Nos. 79 y 82, mostraron las fosas nasales secas en los días 9 y 10 PI; al día 12 PI, ambos mostraron la cabeza agachada; el No. 79, mostró además exudado nasal, estornudos y somnolencia; en los siguientes días ambos lechones se recuperaron.

En resumen, los signos nerviosos se presentaron del día 6 al 11; al día 7 murieron 2 lechones y al día 12 uno; en todos hubo un período de incubación de 3 días con un curso individual que fue de 5 días en los más afectados y de 10 días en el menos afectado. La morbilidad fue del 100 % y la mortalidad del 60 % (Cuadro 2).

### 3.5.1.2. AISLAMIENTO DEL PMVP/LPM DE TEJIDOS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE LECHONES MUERTOS A CAUSA DEL VIRUS.

De las 16 muestras trabajadas: a) en ningún macerado se encontró la presencia de un agente HA; b) en el primer pase realizado en cultivos de células PK-15, se encontraron títulos HA de 1:2 a 1:16, en muestras obtenidas de los 4 lechones; estas muestras correspondieron a diferentes partes del encéfalo y no en todos los lechones fue el mismo; c) en el segundo pase, los títulos HA aumentaron y en esta ocasión fueron de 1:32 a 1:128; y las muestras que habían sido negativas a la presencia de un agente HA en el primer pase, volvieron a ser negativas en el segundo pase. Con el agente HA recuperado de los 4 lechones, se hizo una prueba de IH, utilizando sueros de referencia positivos y

negativos ya mencionados, y los 4 agentes fueron inhibidos con el suero positivo pero no con el negativo (Cuadro No. 3).

### 3.6. DISCUSION.

Estos datos muestran que con las 2 dosis ( $10^{7.0}$  y  $10^{6.0}$ ) empleadas, en los grupos A y B, fue suficiente para provocar signos de la EOA en el 100 % de los lechones. Sin embargo, la letalidad fue del 80 y 60 % para los lechones de los grupos A y B, respectivamente; evidentemente el agente causal fue el PMVP/LPM, ya que se aisló e identificó. Los signos fueron ligeros en los que lograron recuperarse. Como era de esperarse, los lechones sobrevivientes de ambos grupos seroconvirtieron y sus niveles de anticuerpos se incrementaron en los siguientes muestreos (14); el lechón del Grupo A, seroconvirtió a partir del día 10 PI y los 2 lechones del Grupo B mostraron anticuerpos IH a partir del día 13 PI; mientras que uno (No. 79) mostró anticuerpos SN a partir del día 13 y el otro (No. 82) a partir del día 10 (14). A la necropsia y al estudio histopatológico, los lechones que murieron presentaron lesiones similares (15) a las comunicadas en otros estudios experimentales y de campo, con respecto a esta enfermedad (16, 17, 19 y 20). En un trabajo previo realizado con el PMVP/LPM, se observó que al aplicar 2.8 ml  $\times 10^{6.3}$  DICC<sub>50%</sub> por las vías conjuntival, oral y nasal, en lechones de 7 días de edad, se lograron reproducir los signos de la EOA en los 3 lechones inoculados; desafortunadamente de los 3 lechones enfermos, 2 fueron sacrificados "in extremis", por lo que no se puede estar completamente seguro de que no se hubieran recuperado; en esos lechones el período de incubación fue de aproximadamente 7-11 días y el curso de 48-96 h (8). En otro trabajo (21) se comunicó que algunos lechones que mostraron signos nerviosos ligeros y opacidad corneal, se recuperaron. En cuanto a la dosis empleada en este estudio, aparentemente fue mayor que las utilizadas por otros autores, con otros aislados del PMVP, ya que con la dosis de 2 ml  $\times 10^{6.5}$  DICC<sub>50%</sub> por lechón, aplicada por las vías intratraqueal y nasal; y la de  $10^5$  DICC<sub>50%</sub> por lechón, en aerosoles, que llegaron directamente a las cavidades oral y nasal; los autores mencionan que con ambas dosis se observaron mortalidades del 100 y 75 %, respectivamente (8 y 21); aunque en donde se comunicó una mortalidad del 100 % (6) esto no quedó muy claro, ya que se menciona que cuando empezaron a mostrar los signos nerviosos, los lechones fueron sacrificados, por lo que no se sabe si efectivamente iban a morir o se recuperarían como sucedió en el otro experimento mencionado (21); y en el aquí descrito. En cuanto a los métodos empleados, estos, al igual que la dosis empleada, no fueron los mismos y probablemente a eso se deban las diferencias en las letalidades reportadas. También es probable que en estas diferencias hayan influido, el distinto No. del pase y de la "cepa viral".

### 3.7. CONCLUSIONES.

- 1.- Se cuenta con un virus de desafío, capaz de matar al 80-100 % de los lechones de 7 días de edad, cuando estos son inoculados con aerosoles conteniendo la dosis adecuada del PMVP/LPM.

ANEXOS 3

Cuadro No. 1.- SIGNOS CLINICOS EN LECHONES INOCULADOS CON PMVP/LPM/Bvo (28 x 10<sup>7</sup>TCID<sub>50</sub>/PK)

SIGNOS	DIAS POSINOCULACION					
	3	4	5	6	7	8
Lagañas	5/5	5/5	5/5			
Tristeza			2/5			
Tremor			1/5	3/5	1/5	
Blefaritis			3/5			
Estornudo			1/5			
Incoordinacion posterior			3/5	1/5	2/5	
Debilidad			2/5			
Anorexia			2/5			
Opistótonos				1/5		
Pelo hirsuto				2/5		
Ronquido				2/5		
Parálisis posterior				1/5		
Vómito				1/5		
Postración*				2/5	3/5	
Espasmo (convulsión)				1/5		
Muerte					2/5	2/3

\* decubito lateral izquierdo.



Cuadro No. 2.- SIGNOS CLINICOS EN LECHONES INOCULADOS CON PMVP/LPM/Bvo (26 x 10<sup>8</sup>)  
DICC<sub>50</sub>/PK)

SIGNOS	DIAS POSINOCULACION										
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Lagañas	5/5	5/5	5/5								
Afonía						1/3	1/3		1/3		
Ex nasal			1/5			1/3			1/3		
Estornudo		1/5			1/3		1/3		1/3		
Tristeza						1/3					
Incoordinación				2/5	1/3	2/3	1/3	1/3			
Mirada fija				1/5							
Pelo hirsuto				1/5					1/3		
Postración				1/5				1/3	1/3		
Parálisis post				1/5							
Tremor				1/5				1/3			
Espasmos				1/5							
Ceguera						1/3	1/3	1/3			
Pica (Alotriofagia)						1/3					
Caminan en círculos lado izq						1/3	1/3				
Conjuntivitis						1/3	1/3	1/3			
Apoyo de trompa							1/3	1/3			
Debilidad							1/3	1/3	1/3		
"Brinco"							1/3				
Nariz seca							3/3	3/3	1/3		
Constipación									1/3		
Cabeza agachada									2/3		
Muerte					2/5					1/3	

CUADRO No. 3.- REAISLAMIENTO DEL PMVP/LPM EN TEJIDOS DE DE LECHONES MUERTOS A CAUSA DEL VIRUS (DETERMINACION DE LA OL 80%).

LECHON	DOSIS	TEJIDO*	PRUEBA DE IH **
77	$5.4 \times 10^6$ TCID <sub>50</sub>	cerebro posterior	+
88	"	cerebro medio	+
81	$5.6 \times 10^7$ TCID <sub>50</sub>	cerebro posterior	+
84	"	cerebro medio	+

\*Además el virus también se aisló en algunos lechones de cerebro anterior y cerebelo; \*\*se usaron 8 UHA del 2do pase en PK-15 y sueros controles de referencia: uno positivo y otro negativo al PMVP/LPM.

ESTA TRABAJO DE  
SALUD DE LA MONTAÑA

### 3.8. LITERATURA CITADA.

- 1.- Barteling, S. J. and Vreeswijk, J. Developments in foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine*. 1991;(9) 75.
- 2.- Bhatnagar, R. N.; Mittal, K.R.; Padmanaban, V.D.; and Jaiswal, T.N. Heterohemagglutinins in the sera of apparently healthy pigs. *Indian Vet. J.* 1989(66):701-704.
- 3.- Colinas T., A. Curva de multiplicación del Paramyxovirus porcino LPM en la línea celular Pk-15, con base en el título viral, determinado por hemaglutinación y por efecto citopático. Tesis Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 1989:78.
- 4.- Colmenares V., G. Evaluación de la inmunidad conferida por extractos protéicos de Haemophilus Pteropneumoniae, mediante desafío experimental. Tesis Maestría. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, México, D.F., 1990.
- 5.- Correa G., P.; Rodríguez S., B.; y Martínez L., A. Producción de la vacuna PAV-250 contra el cólera porcino con altos títulos, utilizando células Pk-15 libres de contaminación por diarrea viral bovina (BVD) y suero irradiado y ultrafiltrado. En: Mem. de la Reunión de Invest. Pec. en Méx. México, D.F. 1984:144.
- 6.- Fuentes R., J.M. Evaluación de una vacuna experimental contra ojo azul en cerdos mediante las pruebas de inmunogenicidad, inocuidad, potencia y medición de la inmunidad pasiva en lechones. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 1993:30.
- 7.-Fuentes R., M.; Carreón N., R.; Ramírez M., H.; Trujillo, M. E.; De Fraire, I.B. Estudio piloto de la frecuencia de anticuerpos contra el paramixovirus del ojo azul en cerdos de la República Mexicana. *Veterinaria México*, 1992(XXIII):37-39.
- 8.- Galina P., L.; Martínez L., A.; Correa G., P.; Colinas T., A.; Anaya E., A. M.; Agullar R., F.; Ramírez N., R. Transmisión experimental del Paramixovirus Porcino de La Piedad Michoacán (PP-LPM) en cerdos. En Reunión Nacional de Investigación Pecunaria. México, D.F. 1989:84.

- 9.- Hernández-Jáuregui, P.; Sundqvist, A.; Fuentes, M.; Díaz O., A.; Reyes L., J.; Hernández B., E.; Moreno-López, J. Correlación entre las pruebas de virus neutralización, inhibición de la hemaglutinación y ELISA en sueros vacunales y de brote para anticuerpos contra el paramixovirus del síndrome del ojo azul en cerdos. *Veterinaria México*, 1992(XXIII):217-222.
- 10.- Iglesias, G.; Rincón R., F.; Vásquez, B.; Tapia, J.; Domínguez F. Evaluación de una vacuna para la prevención de la enfermedad causada por el paramixovirus porcino. In: *First International Symposium Upon Pig Paramyxovirus*. Puebla, México, 1994:43-44.
- 11.- Moreno-López, J.; Correa-Girón, P.; Martínez L., A.; Ericsson, A. Characterization of a paramixovirus isolated from the brain of a piglet in Mexico. *Archives of Virology*, 1986(91):221-231.
- 12.- Martínez L., A.; Correa G., P.; Fajardo M., R.; Garibay S., M. Aislamiento y estudio de un virus porcino parecido a los paramixovirus. En Correa G P, Morilla G A (eds.) *Encuentro sobre enfermedades infecciosas del cerdo*. México, D.F. 1985:15-21.
- 13.- OIRSA, SARH-CANIFARMA. *Manual de Requisitos Mínimos de Productos Biológicos Veterinarios México, Guatemala, El Salvador, Honduras, Nicaragua, Costa Rica, Panamá y República Dominicana*, 1991.
- 14.- Pallares C., R.; Martínez L., A.; Correa-Girón, P.; Coba A., M.A. Respuesta inmune de anticuerpos IH y SN contra el Paramixovirus Porcino (PMVP) en lechones inoculados con diferentes dosis. *Vet. Méx. Supl.* 1995:121.
- 15.- Pallares C., R.; Fajardo M., R.; Martínez L., A.; Correa-Girón, P.; Coba A., M.A.; Zamora E, J.L. Alteraciones histológicas en lechones inoculados con diferentes dosis del Paramixovirus Porcino (PMVP). *Vet. Méx. Supl.* 1995:122.
- 16.- Pérez P., F.; Stephano H., A.; Gay G., M. Estudio histológico en lechones inoculados experimentalmente con el paramixovirus de ojo azul. En: *Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos (eds.), XXIII Congreso Anual AMVEC*, León, Gto., México, 1988:81-83.

- 17.- Ramírez N., R.; Martínez L., A.; Correa G., P.; Colinas T., A. Un brote de paramixovirus encefálica en cerdos de una granja del estado de México. En: Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos (eds.). II Congreso ALVEC, XII Convención AMVEC y III Encuentro UNPC, Acapulco, Gro., México, 1987:64-67.
- 18.- Snyder, M. L.; Stewart, W.C.; and Kresse, J.I. Microtitration neutralization test for pseudorabies and transmissible Gastroenteritis viruses. In: Serologic microtitration techniques. USDA, APHIS, VS, NVSL, Ames, Iowa, USA, 1981:44- 48.
- 19.- Stephano H., A.; Gay G., M.; Ramírez T., C.; Maqueda A., J.J. Estudio de un brote de encefalitis en lechones por un virus hemaglutinante. En: Asociación Mexicana de Veterinarios especialistas en Cerdos (eds.) XVII Convención AMVEC, Ixtapa, Guerrero, México, 1981.
- 20.- Stephano H., A.; Gay G., M. Experimental studies on a new viral syndrome in pigs called "blue eye", characterized by encephalitis and corneal opacity. In: 8th International Pig Veterinary Society Congress, Ghent, Belgium, 1984: chap II:71.
- 21.- Stephano H., A. Eficacia de una vacuna inactivada para el control del paramixovirus de ojo azul en lechones inoculados experimentalmente. En: CANIFARMA (eds.). Industria Farmacéutica Veterinaria; Premo Canifarma, 1991(1):35-45.
- 22.- U.S. Government Printing Office Washington. Code of Federal Regulations (CFR); animal and animal products. Published by The Office of The Federal Register, National Archives and Records Administration as a Special Edition of The Federal Register. 9 CFR 1.1, 1992:789.
- 23.- Zamora G., J.; Martínez L., A.; Correa G., P.; Colinas T., A. Estudio preliminar en cerdos de dos vacunas inactivadas experimentales elaboradas con el paramixovirus porcino de La Piedad Michoacán. En: AMVEC (eds.). XXV Congreso Nacional AMVEC. Puerto Vallarta, Jal., México, 1990:61-64.

#### CAPITULO IV

**PROTECCION PASIVA CONFERIDA A LECHONES DE CERDAS VACUNADAS, CON UNA VACUNA INACTIVADA CONTRA LA ENFERMEDAD DEL OJO AZUL.**

**Trabajo premiado con el segundo lugar del: "Premio CANIFARMA Dr. Alfredo Tollez Girón Rode 1995".**

#### 4.1. RESUMEN

Con el fin de evaluar la protección pasiva transferida a sus lechones mediante el calostro, en cada uno de dos experimentos se vacunaron 2 cerdas gestantes, seronegativas al PMVP/LPM, con una vacuna oleosa, inactivada con irradiación gamma, contra la EOA. Cada cerda recibió 2 dosis de 4 ml de vacuna: las 2 del experimento 1, se vacunaron a los 81 y 85 días de gestación; se dejó como control a una tercera cerda gestante que sólo recibió placebo en los días mencionados; las otras dos del Experimento 2, se vacunaron a los 85 y 100 días, y a los 86 y 101 días de gestación, respectivamente; y otra cerda control adicional, también recibió el tratamiento con el placebo. Cuando los lechones de las cerdas vacunadas (LCV) y los de la control del Experimento 1, tenían 7 y 8 días de edad, respectivamente, y cuando los LCV y los de la cerda control del Experimento 2 tenían 4, 6 y 7 días de edad, respectivamente, cada grupo por separado se desafió con aerosoles del PMVP/LPM, a una dosis que previamente había demostrado que era capaz de matar al 80-100 % de lechones susceptibles. La vacunación de las cerdas estimuló la producción de anticuerpos que se transfirieron a través del calostro a la prole; los cuales en los LCV del Experimento 1 evitó la presentación de hipertermia en el 80 % y los signos clínicos en el 100 %; mientras que de los lechones testigos, el 85 % (6 de 7) mostraron hipertermia y todos manifestaron signos ligeros de la EOA y se recuperaron, no obstante que la dosis utilizada ( $1.77 \text{ ml} \times 10^{7.9} \text{ DICC}_{50\%}$ /lechón) no produjo mortalidad; uno de ellos presentó signos nerviosos y opacidad corneal. En el Experimento 2, nuevamente el 100% de los LCV, sobrevivieron sin mostrar signos de la EOA; mientras que en uno de los grupos controles (Grupo 2A) se observó una morbilidad del 100 % y en el otro grupo (Grupo 2B) una morbilidad del 80 % y una letalidad del 60 %; en este segundo experimento, la dosis de desafío fue de  $6 \text{ ml} \times 10^{8.35} \text{ DICC}_{50\%}$ /lechón y de  $6 \text{ ml} \times 10^{4.35} \text{ DICC}_{50\%}$ /lechón de los grupos 2A y 2B, respectivamente. Al estudiar el suero calostroal (SC) colectado el día del parto, los de las cerdas controles, no vacunadas, de ambos grupos fueron negativos a Acs IH y SN contra el PMVP/LPM; mientras que en una de las cerdas vacunadas del experimento 1, se encontraron títulos IH (TIH) de 1:5 y títulos SN (TSN) de 1:2, y en la otra se encontraron TIH de 1:5 y TSN de 1:64; en los sueros sanguíneos (SS) (de las cerdas del Experimento 1), colectados un día previo (6 días de edad) al desafío de los lechones, en la primera cerda no se detectaron TSN ni TIH, mientras que en los de la segunda cerda hubo TIH de 1:5 y TSN de 1:16; posteriormente sólo esta cerda mostró TIH de 1:5 a los 21 y 30 días posparto (PP) y de 1:10 al día 14 PP; y TSN de 1:16 a los 6 y 14 días PP y de 1:32 a los 21 días PP. En las cerdas del Experimento 2, el día del parto, los SC de las 2 cerdas vacunadas, tenían TIH de 1:40 y 1:80 y TSN  $\geq$  1:128; y el día del desafío (DD) dichas cerdas tenían TIH de 1:10 y TSN de 1:64 en el SS. A los 6 días de edad (1 día previo al desafío) 6 de los 10 LCV del Experimento 1, mostraron TIH de 1:5 y 9 TSN de 1:4 a 1:32 (TSN promedio de 1:20); después, estos lechones fueron negativos a la prueba de IH y mostraron TSN promedio de 1:9, 1:6 y 1:3.6, en los muestreos realizados a los 14, 21 y 30 días de edad, respectivamente; mientras que los

7 lechones de la cerda control no vacunada, empezaron a mostrar TSN de 1:2 a 1:16 (TSN promedio de 1:4) el día 14 después del desafío y al día 23 PD, TIH de 1:10 a 1:20 (TIH promedio de 1:14); dos controles separados fueron negativos a TIH y TSN. El día en que los 12 LCV, del Experimento 2, fueron desafiados, mostraron junto con sus 6 hermanos no desafiados, TIH de 1:5 en 7 (39 %); 1:10 en 5 (28 %); 1:20 en 4 (22 %) y 1:40 en 2 (11 %); y TSN de 1:16 en 1 (5.5 %); 1:32 en 2 (11.1 %); 1:64 en 7 (39 %); y  $\geq$  1:128 en 8 (44.4 %). El día del desafío, las cerdas controles de ambos grupos y sus lechones, fueron negativos a anticuerpos IH y SN vs el PMVP/LPM.



#### 4.2. INTRODUCCION.

La Enfermedad del Ojo Azul (5), producida por el PMVP (22) de La Piedad, Michoacán (LPM) (3, 25), es una nueva enfermedad de los cerdos que afecta principalmente a los lechones lactantes (9, 17, 29, 35, 36) y a los cerdos adultos (1, 31, 37), y llega a ocasionar pérdidas económicas importantes por morbilidad y mortalidad (20, 33, 35, 36). La EOA se sigue difundiendo hacia áreas libres (7). Para prevenir y aminorar los daños económicos que causa a la porcicultura nacional, es necesario producir una vacuna eficaz, que evite la presentación de los signos de la enfermedad y la mortalidad; y que por lo tanto cumpla con los futuros Requisitos Mínimos, que seguramente serán exigidos en un futuro a las vacunas comerciales de este tipo, por parte de la Dirección General de Salud Animal, SAGAR (26).

En el CENID-MV, INIFAP, SAGAR, en estudios preliminares se elaboraron y probaron 2 tipos de vacunas inactivadas experimentales vs la EOA, en una se utilizaba un adyuvante oleoso y en la otra se empleó gel de hidróxido de aluminio. Al comparar la antigenicidad de ambas, en cerdos de diferentes edades, se demostró que la vacuna oleosa, estimuló mejores títulos de Acs IH y SN, que la vacuna preparada con el gel de hidróxido de aluminio (24, 42). Por otra parte, hay varias publicaciones que mencionan que la EOA afecta principalmente al aparato reproductor de cerdas adultas (10, 23, 37) y verracos (1, 31) y a lechones lactantes (8, 9, 10, 29, 34, 37, ), de tal modo que para prevenir la enfermedad en los lechones quizás se debería vacunar a las cerdas en la etapa de gestación, tal como ocurre en la prevención de colibacilosis (28), rotavirus (13, 41) y gastroenteritis transmisible (26). En cuanto a la prevención de la EOA, en cerdas gestantes, se ha informado sobre algunas vacunas inactivadas, (6, 11, 12, 38); sin embargo, sólo a 2 de estas vacunas se les ha evaluado mediante una "prueba de potencia", desafiando a los lechones procedentes de cerdas previamente vacunadas durante la gestación; y aunque se utilizaron virus de desafío que no fueron previamente titulados en lechones, la inmunidad pasiva protegió al 71 % y 81.5 % de los lechones, respectivamente (6, 38).

#### **4.3. OBJETIVO PARTICULAR.**

**El objetivo del presente trabajo fue el de evaluar ante el desafío con un lote de PMVP/LPM capaz de producir por lo menos 80 % de mortalidad, la protección pasiva, transferida a los lechones procedente de cerdas previamente vacunadas, con una vacuna contra el EOA inactivada y emulsionada en aceite.**

#### 4.4. MATERIAL Y METODOS

##### 4.4.1 VIRUS VACUNAL Y PARA EL DESAFIO.

###### 4.4.1.1 VIRUS VACUNAL.

Se produjo un lote del octavo pase del PMVP/LPM en monocapas de células PK-15, a partir del pase 7, de acuerdo al procedimiento mencionado en los Capítulos II y III; con el lote mencionado, se prepararon alícuotas de 50 ml y de 1.8 ml, que se guardaron en congelación a -70 C. Al momento de descongelar una alícuota de 50 ml para ser inactivada, se descongeló simultáneamente otra alícuota de 1.8 ml para ser titulada. El lote en cuestión, tenía un título HA de 1:64/0.05 ml, ante eritrocitos de pollo; y de  $10^{7.9}$  DICC<sub>50%</sub>/ml, por ECP.

###### 4.4.1.2 ELABORACION DE LA VACUNA.

El lote de virus para la vacuna, se iradió con rayos gamma (2.5 Megarads) (27), y se comprobó su inactivación mediante 3 pases seriados, realizados en monoestratos de células PK-15; la suspensión viral inactivada se empleó para preparar un lote de vacuna, de acuerdo al procedimiento ya descrito en el Capítulo II de esta tesis, y brevemente se mencionará que la vacuna tenía una composición de 50% de suspensión viral/PMVP y 50% de adyuvante oleoso; también se preparó un placebo, para los controles, compuesto de 50 % de cultivos de células PK-15 lisadas y 50 % del adyuvante.

###### 4.4.1.3 VIRUS DE DESAFIO.

Para desafiar a los lechones de las cerdas del Experimento 1, de los realizados en este Capítulo, se emplearon alícuotas del pase 8 utilizado en los experimentos del Capítulo III. Y dado que tal lote era insuficiente para desafiar a los lechones del Experimento 2, de éste capítulo, se produjo otro lote del octavo pase del PMVP/LPM, para desafiar a estos lechones. El lote de virus se produjo a partir del pase 7, de acuerdo al procedimiento mencionado en los Capítulos II y III; con este nuevo lote, se prepararon alícuotas de 1.8 ml, que se guardaron en congelación a -70 C. Siete días antes del desafío de los lechones, se descongeló una alícuota de 1.8 ml para ser titulada. El lote en cuestión, tenía un título HA de 1:64/0.05 ml, ante eritrocitos de pollo; y de  $10^{6.35}$  DICC<sub>50%</sub>/ml, por ECP.

#### 4.4.2. CERDAS EMPLEADAS

##### 4.4.2.1. ALOJAMIENTO DE LAS CERDAS

Se utilizaron 6 cerdas que estaban en el tercer tercio de gestación, seronegativas al PMVP/LPM, que fueron alojadas en una Unidad de Aislamiento, ya descrita en el Capítulo III de esta tesis, y al parto, sus lechones recibieron los cuidados también ya mencionados en tal capítulo; en el local mencionado, primero se alojaron las 3 cerdas del Experimento 1 y una vez terminado ese experimento, la unidad entera fue lavada, desinfectada y encalada perfectamente para introducir a las otras 3 cerdas del Experimento 2.

##### 4.4.2.1.1. CERDAS DEL EXPERIMENTO 1.

En el Experimento 1, el grupo de 3 cerdas estuvo constituida por: una de segundo parto y dos de noveno parto, provenientes de una granja convencional sin antecedentes clínicos de la EOA, cuyo pie de cría fue previamente probado y se encontró que era negativo a anticuerpos IH y SN vs la EOA. Las cerdas eran el producto de las cruzas alternativas entre las razas Yorkshire, Hampshire y Landrace; en la granja de donde procedían, únicamente se vacunaba contra la Fiebre Porcina Clásica (FPC).

##### 4.4.2.1.2. CERDAS DEL EXPERIMENTO 2.

En el Experimento 2, el grupo estuvo constituido por 3 cerdas primerizas, seronegativas a anticuerpos IH y SN, vs la EOA; procedentes de otra granja convencional, también sin antecedentes clínicos de la EOA y de la cual también previamente se comprobó que sus animales fueran negativos a esta enfermedad; y en donde sólo se vacuna contra la FPC; estas cerdas provenían de las cruzas hechas entre las razas Landrace y Duroc.

#### 4.4.3. VACUNACION DE LAS CERDAS

##### 4.4.3.1. GRUPO DE CERDAS DEL EXPERIMENTO 1.

En el Cuadro 1, se pueden observar las características de las cerdas del Experimento 1, dos de las cuales, fueron vacunadas, por vía IM en los jamones, con la vacuna inactivada oleosa/PMVP-LPM del lote previamente preparado; cada cerda recibió 2 dosis, de 4 ml cada una, a los 81 y 95 días de gestación; una cerda, en su segundo parto, que estaba en el tercer tercio de gestación, fue dejada como control, a

la que únicamente se le aplicó el placebo en los mismos días, dosis y vía empleadas en las cerdas vacunadas.

#### 4.4.3.2. GRUPO DE CERDAS DEL EXPERIMENTO 2.

En el Experimento 2, dos cerdas fueron vacunadas, con la vacuna inactivada oleosa/PMVP-LPM y una se dejó como control. Dos de las cerdas recibieron 2 aplicaciones, de 4 ml, de la vacuna por vía IM, la primera a los 85 y 86 días de la gestación, respectivamente, y la segunda a los 15 días después; y a la cerda control se le inyectó el placebo a los 87 días y a los 15 días después.

#### 4.4.4. DESAFIO DE LOS LECHONES

##### 4.4.4.1. LECHONES DEL EXPERIMENTO 1.

Cuando los 10 lechones (Grupo 1A), de las 2 cerdas vacunadas, tenían 7 días de edad, y los 7 de 9 (Grupo 1B) de la cerda control 8 días de edad, fueron desafiados con aerosoles dentro de una cámara (2), en donde los 17 lechones juntos, del Experimento 1, recibieron los aerosoles provenientes de  $30 \text{ ml} \times 10^{7.9} \text{ DICC}_{50\%}$  del PMVP/LPM/8<sup>a</sup> pase, durante 30 min; los 2 lechones restantes no desafiados, de la cerda control, fueron separados previamente y sirvieron como controles separados.

##### 4.4.4.2. LECHONES DEL EXPERIMENTO 2.

###### 4.4.4.2.1. LECHONES DE LA CERDA CONTROL NO VACUNADA.

Con los 10 lechones, de 7 días de edad, de la cerda control (del Experimento 2), se hicieron 2 grupos de 5 (2A y 2B), seleccionados al azar y se inocularon por separado dentro de una cámara (2). El primer grupo (2A), recibió los aerosoles provenientes de  $30 \text{ ml} \times 10^{7.35} \text{ DICC}_{50\%}/\text{ml}$  del PMVP/LPM/8<sup>a</sup> pase, durante 55 min; el segundo grupo (2B), recibió  $30 \text{ ml} \times 10^{6.35} \text{ DICC}_{50\%}$  del PMVP/LPM/8<sup>a</sup> pase, durante 45 min.

###### 4.4.4.2.2. LECHONES DE LAS CERDAS VACUNADAS.

Respecto a los lechones de las 2 cerdas vacunadas del Experimento 2, cuando éstos tenían 4 y 6 días de edad, respectivamente, fueron inoculados con aerosoles, dentro de la cámara de mencionada

en el Capítulo III (2). De los 12 lechones de 6 días de edad de una de las cerdas vacunadas, se seleccionaron al azar 6 para formar el Grupo 2C; y de los 7 lechones de 4 días de edad, de la otra cerda vacunada, también se seleccionaron al azar 6 para formar el Grupo 2D; ambos grupos fueron desafiados, por separado, cada uno con 36 ml de alicuotas del mismo lote del PMVP/LPM empleado en el Grupo 2A; el Grupo 2C, recibió los aerosoles durante 70 min y el Grupo 2D, durante 53 min. Se dejaron sin desafiar 7 lechones de las 2 cerdas vacunadas, a los que únicamente se les midieron los Acs IH y SN.

#### 4.4.5. SEGUIMIENTO DEL COMPORTAMIENTO CLINICO Y DE LAS TEMPERATURAS RECTALES DE LOS LECHONES.

Una vez que los lechones de los experimentos 1 y 2, fueron inoculados, estos fueron regresados con sus madres. A todos se les registró diariamente la temperatura rectal, por un periodo de 18 días posdesafío (PD). También se les realizó diariamente, a ellos y sus madres, un examen clínico desde su nacimiento hasta los 35 días de edad (28, 29, 31 y 32 días posdesafío).

#### 4.4.6. SEGUIMIENTO SEROLOGICO.

##### 4.4.6.1. EXPERIMENTO 1.

Cada una de las cerdas fueron muestreadas para la obtención de suero sanguíneo, previo a cada una de las aplicaciones de la vacuna y/o placebo; en el Cuadro No. 9, puede observarse además, que el día del parto y, uno y dos días después, se les obtuvo calostro y se separó el suero calostrado, posteriormente se les obtuvo suero sanguíneo junto con sus lechones (Cuadro No. 10), a los 6, 14, 21 y 30 días posteriores al parto. Los lechones que sirvieron como controles separados, fueron muestreados para la obtención de SS a los días 7 y 14 después de que fueron desafiados sus hermanos.

##### 4.4.6.2. EXPERIMENTO 2.

Cada una de las cerdas fueron muestreadas (Cuadros Nos. 12 y 13) para la obtención de SS, previo a cada una de las aplicaciones de la vacuna y/o placebo; el día del parto se obtuvo calostro de las cerdas, y se separó el suero calostrado; y posteriormente, tanto de ellas como de sus lechones (Cuadro No. 13) cuando estos tenían 4, 6, y 7 días de edad, respectivamente se obtuvo sangre para separar el suero sanguíneo. Con las muestras de suero de los animales de los 2 experimentos, se realizaron pruebas de SN e IH, utilizando como antígeno al PMVP/LPM. Las pruebas serológicas se hicieron de acuerdo al procedimiento ya descrito en el Capítulo I, de esta tesis.

#### 4.5. RESULTADOS

##### 4.5.1. TEMPERATURAS DE LOS LECHONES.

###### 4.5.1.1. LECHONES DE LAS CERDAS DEL EXPERIMENTO 1.

En el Cuadro 2, se puede observar que de los 7 lechones (Grupo 1B), de la cerda control no vacunada del Experimento 1, seis (85 %) mostraron temperaturas rectales de que variaron entre 40 C y 41 C, entre los días 4 y 12 PD; mientras que sólo en 2 (20 %) de los lechones, del Grupo 1A, de las cerdas vacunadas, hubo temperaturas de 40 C a 40.3 C, por uno y 2 días consecutivos (en el día 10 y en los días 11 y 12 PD), respectivamente. Los 2 lechones testigos separados, no manifestaron alteraciones en sus temperaturas rectales.

En el Cuadro 3, se comparan los promedios de las temperaturas registradas diariamente en los lechones procedentes de las 2 cerdas vacunadas (Grupos 1A), contra los de la cerda control (Grupo 1B); puede apreciarse que durante 5 días consecutivos (del día 4 al día 8 PD), se registraron temperaturas promedio de 40 a 40.3 C en los lechones de la cerda control, mientras que los de las cerdas vacunadas no pasaron de 39.5 C. En el Cuadro No. 4, se aprecian las temperaturas  $\geq$  a 40 C de los lechones de la cerda control; presentándose la hipertermia durante 2 etapas, de uno o varios días.

###### 4.5.1.2. LECHONES DE LAS CERDAS DEL EXPERIMENTO 2.

###### 4.5.1.2.1. LECHONES CONTROLES DE CERDAS NO VACUNADAS DEL EXPERIMENTO 2.

###### 4.5.1.2.1.1. PRIMER GRUPO CONTROL.

En el Cuadro 5, se anotan las temperaturas rectales de los lechones controles del Grupo 2A del Experimento 2, y en él se puede observar que durante los primeros 6 días PD, los 5 mostraron temperaturas de 40 a 40.7 C (que duraron de 1 a 5 días). Posteriormente se normalizaron y a los 8 días PD, empezaron a mostrar una marcada hipotermia, y luego murieron entre el 9<sup>o</sup> y 12<sup>o</sup> día.

###### 4.5.1.2.1.2. SEGUNDO GRUPO CONTROL.

En el Cuadro 6, están anotadas las temperaturas rectales de los lechones controles del Grupo 2B,

del Experimento 2, y en él se observa que hubo muy ligeras elevaciones de temperatura, en 4 de los 5 lechones inoculados, y que éstas fueron esporádicas; duraron generalmente un día, excepto en un caso en el que duraron 2 días consecutivos; y no pasaron de 40 C, excepto en uno, que tuvo 40.1 C durante un día.

#### 4.5.1.2.2. LECHONES DE CERDAS VACUNADAS DEL EXPERIMENTO 2.

Lechones de los grupos 2C y 2D.- De los lechones de las dos cerdas vacunadas en el Experimento 2, sólo 4 de los 12 lechones desafiados mostraron temperaturas de 40-40.2 C, después del desafío; de estos 4 lechones desafiados, 3 mostraron 40 C por un sólo día; y uno, al principio 40 C por un día, y posteriormente 40.1 y 40.2 C por dos días consecutivos.

#### 4.5.2. SIGNOS CLINICOS

##### 4.5.2.1. CERDAS DE LOS EXPERIMENTOS 1 Y 2.

En el sitio de inyección de la vacuna y/o el placebo, al día siguiente se observó una inflamación de aproximadamente 1.5 cm de diámetro, que posteriormente fue disminuyendo de tamaño hasta que ya no se observaba a simple vista a los 8 días después de la aplicación de la vacuna y/o el placebo respectivo. La inflamación se observó después de la primera y segunda aplicación de la vacuna y/o el placebo en las cerdas de los Experimentos 1 y 2. Con excepción de las reacciones locales mencionadas, en todas las cerdas, de ambos experimentos, se observó un comportamiento clínico normal, durante el periodo de vacunaciones, al parto, y antes y después del desafío de sus lechones.

##### 4.5.2.2. LECHONES CONTROLES DEL EXPERIMENTO 1.

En el Cuadro 7, se observa que del día 4 al 10 PD, en los 7 lechones (Grupo 1B), de la cerda control del Experimento 1, se observó: amontonamiento, frecuencia respiratoria aumentada, pelo hirsuto, tialismo, conjuntivitis, lagañas, y somnolencia; del día 8 al 11 PD, en uno (lechón No. 429) se observó además: afonía, blefaritis, tortícolis hacia el lado derecho e incoordinación al caminar y caminaba hacia su lado izquierdo, durante los días 9, 10, 11 y 12; y del día 8 al 10 PD, también mostró opacidad corneal, que desapareció completamente al día 11 PD. Los 2 lechones controles separados, se mantuvieron clínicamente sanos.



#### 4.5.2.3. LECHONES DEL EXPERIMENTO 2.

##### 4.5.2.3.1. LECHONES DE LA CERDA CONTROL NO VACUNADA OEL EXPERIMENTO 2.

###### 4.5.2.3.1.1. PRIMER GRUPO CONTROL (GRUPO 2A).

Después del desafío, los lechones del primer grupo control (Grupo 2A) de la cerda no vacunada del Experimento 2. mostraron lagañas a partir del día 2; al día 4 se observó además, amontonamiento; los días 6 y 7 hubo exudado nasal, conjuntivitis y blefaritis; entre los días 7 y 8, perdieron grasa, pero tenían buen estado de carnes, y empezaron los signos de lipo nervioso, que consistieron en temblor general, incoordinación posterior, opistótonos, parálisis posterior, parálisis mandibular, torticollis, convulsiones, mirada fija, postración, además de conjuntivitis, blefaritis, párpados pegados, exudado nasal, estornudos, debilidad, anorexia, pelo hirsuto, ronquidos, parálisis mandibular, reflejo palpebral lento, eritema en vientre, boca, orejas y fotofobia. Al día 9, murieron 2 lechones y en cada uno de los días 10, 11 y 12 también murió uno. Se observó una morbilidad del 100%; la mortalidad también fue del 100% y ocurrió entre los 9 y 12 días posdesafío.

###### 4.5.2.3.1.2. SEGUNDO GRUPO CONTROL (GRUPO 2B).

Después del desafío, los lechones del segundo grupo control (Grupo 2B), de la cerda no vacunada, también mostraron lagañas a partir del día 2. En estos lechones, el cuadro clínico fue menos severo y los signos nerviosos se presentaron en 2 lechones a partir del día 9 y en uno a partir del día 11; sin embargo, en un cuarto lechón el cuadro fue agudo ya que murió al día 8 posdesafío, mientras que el día previo sólo mostró apatía, inactividad y permaneció echado bajo la fuente de calor; otro lechón murió a los 14 días (segundo lechón muerto), y previamente al día 10 PO había mostrado somnolencia y al día 11 ya estaba postrado completamente; un tercer lechón mostró signos nerviosos y opacidad corneal unilateral a partir del día 9 y a partir de ese día se mantuvo postrado, hasta su muerte (tercer lechón muerto), que ocurrió al día 21 PD (murió con la opacidad corneal); el cuarto lechón de este grupo enfermó en forma severa a partir del día 9, aunque sin postrarse completamente, a partir del día 16 se empezó a recuperar paulatinamente, para el día 18 ya se veía aparentemente normal, y al día 33 ya estaba clínicamente sano, con evidente retraso de peso, aunque no quedó del todo bien; el quinto de los lechones de este grupo nunca enfermó. En este grupo se observó una morbilidad del 80% y una mortalidad del 60% que ocurrió entre los días 8-21 posdesafío con presentación de opacidad corneal, unilateral, en un lechón. Los lechones presentaron lesiones macroscópicas que en términos generales fueron similares a las informadas en otros estudios experimentales y de campo correspondientes a esta

enfermedad (29, 33, 34).

#### 4.5.2.3.2. LECHONES DE LAS CERDAS VACUNADAS DEL EXPERIMENTO 2

En los lechones de las cerdas vacunadas, de los grupos 2C y 2D, del Experimento 2, ninguno, mostró signos de la EOA después del desafío; excepto uno, que no mostró fiebre, pero sí una ligera incoordinación del tren posterior y miembro anterior derecho, a partir del día 8 PD, la cual fue desapareciendo y 11 días después ya estaba completamente restablecido y sin pérdida de su estado de carnes, ni de su apetito. En los 7 lechones restantes de las cerdas vacunadas, que no fueron desafiados, pero que permanecieron en contacto con sus hermanos que sí fueron desafiados, tampoco se observó ningún signo clínico.

#### 4.5.3. RESPUESTA INMUNE HUMORAL

##### 4.5.3.1. EXPERIMENTO 1: CERDAS VACUNADAS Y SUS LECHONES.

Los sueros colectados antes de la primera (día 0) y segunda vacunaciones (día 14 posvacunación) de las 2 cerdas vacunadas del Experimento 1, fueron negativos a Acs IH y SN; mientras que en el Cuadro 8, se puede observar que a los 32 días después de la primera vacunación de las 2 cerdas, las pruebas de IH y SN ya fueron positivas. Respecto a una de las cerdas vacunadas (No. 163), podemos observar que en los calostros colectados el día del parto y el primer día posparto (PP), se encontraron títulos de Acs IH de 1:5 y SN de 1:2; y al tercer día PP su suero calostroal (SC), y el SS de los subsiguientes muestreos fueron negativos. Con respecto a la otra cerda vacunada (No. 319), su SC, al día del parto mostró títulos IH de 1:5 y SN de 1:64; al primer día PP, el SC mostró títulos IH de 1:5 y SN de 1:32; en los muestreos, de los 6, 21, y 30 días PP, en el SS hubo títulos IH de 1:5; en el muestreo del día 14 PP el título IH fue de 1:10; y el título SN de 1:16 los días 6 y 14 PP; y SN de 1:32, al día 21; al suero colectado el día 30 PP, no se le hizo la prueba de SN. En el período de observación, la cerda control No. 323, fue negativa a las pruebas de IH y SN, tanto en el SC como en el SS.

En el Cuadro 9, se observa que 6 de los 10 LCV mostraron títulos IH de 1:5, y 9 mostraron títulos SN de 1:4 a 1:32 (sólo uno mostró un título SN de 1:4), con títulos promedio (TP) SN de 1:20, a los 6 días de edad (1 día predesafío); y después, los Acs IH ya no se detectaron; y los títulos de Acs SN fueron descendiendo los días 7, 14 y 23 PD, con TP de 1:9, 1:6 y 1:3.6, respectivamente. El LCV No. 100, no mostró Acs IH ni SN, (excepto títulos de 1:2 a los 21 días de edad, esto es a los 14 días PD), y por otra parte su madre mostró títulos bajos (IH de 1:5 y SN de 1:2) en el SC al día del parto y al primer día PP

(Cuadro 9).

En el Cuadro 10 se muestra que los 7 lechones controles (Grupo 1B), de la cerda no vacunada, presentaron seroconversión al día 14 PD, mostrando títulos SN de 1:2 a 1:8 (de todos el único positivo por IH con un título de 1:5, había mostrado un título SN de 1:8); el día 23 PD en todos ya había títulos IH de 1:10 a 1:20 (TP IH de 1:14). Los 2 lechones controles que fueron mantenidos separados, siempre fueron negativos a anticuerpos IH y SN en los muestreos que se les realizaron al día 7 (en los dos) y al día 14 (en uno).

#### 4.5.3.2. EXPERIMENTO 2: CERCAS VACUNADAS Y SUS LECHONES.

En el Cuadro 11, se puede observar que en el suero sanguíneo de las dos cerdas vacunadas, del Experimento 2, no se encontraron Acs antes de la vacunación, y éstos se empezaron a encontrar a los 15 días después de la primera vacunación, con títulos SN de 1:32; el día del parto (11 y 13 días después de la segunda vacunación/28 y 27 días después de la primera vacunación), en el suero cafostral de ambas se encontraron títulos de Acs SN de 1:128 y títulos de Acs IH de 1:40 y 1:80. En los muestreos realizados en ambas fechas, la cerda control salió negativa.

En el Cuadro 12, se puede observar que a los 31 y 32 días después de la primera vacunación (diecisiete días después de la segunda vacunación), en el SS de las 2 cerdas vacunadas (el día del desafío de sus lechones), se encontraron títulos de Acs IH de 1:10 y SN de 1:64; mientras que en sus lechones desafiados, se encontraron títulos de Acs IH de 1:5 a 1:40 y títulos de Acs SN de 1:16 a 1:128.

En el Cuadro 13, se puede observar que los lechones no desafiados con el PMVP/LPM de la cerdas mencionadas, mostraron títulos de Acs IH de 1:5 a 1:40 y títulos de Acs SN de 1:84 a 1:128. Al agrupar a los lechones, desafiados y sin desafiar con el PMVP/LPM, de las 2 cerdas vacunadas (52-4 y 37-8) del Experimento 2, en el Cuadro 14 pueden observarse los porcentajes correspondientes de lechones que mostraron los diferentes títulos de Acs IH y SN; en cuanto a los Acs IH los títulos fueron de: 1:5 en 7 (39%); 1:10 en 5 (28 %); 1:20 en 4 (22 %) y 1:40 en 2 (11 %); y en relación a los Acs SN los títulos fueron de: 1:16 en 1 (5.5%), 1:32 en 2 (11.1 %), 1:64 en 7 (39 %) y  $\geq$ 1:128 en 8 (44.4 %).

#### 4.6. DISCUSION

En el experimento 1, podrá observarse que hubo una morbilidad del 100%, con signos clínicos moderados, pero no letalidad en todos los lechones controles (Grupo 1B) de la cerda no vacunada, no obstante que a los 8 días de edad todavía son susceptibles (17, 38). Probablemente la ausencia de signos más severos y la no letalidad se deba a que se desafiaron al mismo tiempo, juntos, los 17 lechones y la cantidad de 30 ml repartida en los 3 nebulizadores, dió por resultado una relación de 1.77 ml/lechón, en vez de 5.6 ml/lechón que se había empleado anteriormente, cuando se logró una letalidad del 80% y morbilidad del 100% (Capítulo III). Por lo tanto la cantidad empleada en esta ocasión disminuyó 3.18 veces; aunado a lo anterior a que los lechones permanecieron sólo 30 min dentro de la cámara y al momento de sacarlos, se observó que todavía quedaban aerosoles y que por lo tanto, cada lechón aspiró obviamente una cantidad mucho menor a los 1.77 ml del inóculo. Anteriormente ya se había empleado este método de inoculación con el PMVP/VSOA en lechones recién destetados (8), pero no en lechones lactantes, en los que por primera vez se utiliza y por lo mismo es poca la información existente (28). En otros trabajos de desafío con el PMVP, han utilizado dosis de  $10^5 \text{DICC}_{50\%}/\text{ml}$ /lechón, aplicados directamente por aerosol por vía intranasal a lechones susceptibles de 7 días de edad (38) y  $2 \text{ ml} \times 10^{4.5} \text{DICC}_{50\%}/\text{lechón}$ , repartidas por las vías intratraqueal (0.5 ml) e intranasal (1.5 ml) a lechones controles susceptibles de 4 días de edad (6). Evidentemente la dosis de desafío empleada en este trabajo, fue bastante alta si se le compara con los trabajos mencionados, ya que la cantidad de partículas infecciosas por lechón empleada aquí fue de alrededor de 1400 veces mayor; aunque hay que recalcar que el inóculo empleado por Stephano (1991) y Fuentes (1993) fue depositada directamente en las cavidades mencionadas de cada lechón, situación que no ocurrió en nuestros experimentos, en los que probablemente cada lechón aspiró muy pocas partículas de las depositadas por los 3 nebulizadores dentro de la cámara de aerosoles. Por la cantidad empleada, probablemente el virus no sea tan virulento como los reportados por los trabajos mencionados (6, 38). Lo anterior sugiere que el desafío no fue lo suficientemente riguroso para inducir letalidad del 80% y signos clínicos más severos, en los controles. Sin embargo, dichos controles mostraron varios signos de la enfermedad y fiebre recurrente durante dos periodos de 4-5 días; excepto un lechón que no mostró ningún signo clínico ni fiebre. La manifestación de fiebre entre 40 y 41 C está por encima de las esperadas en lechones de esta edad (18), y además coincide con un informe anterior, en el que se inocularon lechones convencionales recién destetados, que mostraron ligera hipertermia a los días 4 y 6 después del desafío (8). En otro informe se menciona que de 21 lechones, de cerdas vacunadas, desafiados con POA a los 7, 11 y 13 días de edad, que no manifestaron ningún signo de la EOA, sólo 8 (38%) mostraron únicamente fiebre entre los días 5 y 10 PI (38). Los datos anteriores sugieren que probablemente la edad ideal para hacer el desafío controlado por aerosoles dentro de una cámara, es entre 4 y 7 días; esto está apoyado por otros trabajos. (6, 9, 17, 28,

38); y de acuerdo con los datos anteriores y los mencionados en el Capítulo III de esta tesis quizás la dosis ideal por lechón y el tiempo de permanencia dentro de la cámara, para aspirar los aerosoles con virus, sea de 6 ml X 10<sup>6</sup> por 55 min o de 5.6 ml X 10<sup>6</sup> DICC<sub>50</sub> del PMVP/LPM, durante 30 min. respectivamente, para provocar una morbilidad del 100% y una letalidad mínima del 30 %.

Por otra parte los lechones de las cerdas vacunadas no mostraron ningún signo; únicamente 2 mostraron temperaturas de 40 C en 2 días esporádicos. Estos hallazgos preliminares, demuestran que no obstante que la vacuna provocó una reacción local en las cerdas vacunadas, fue antigénica, y que la prueba de potencia demostró que protegió de la presentación de signos clínicos al 100% de los lechones, de madres vacunadas; mientras que todos los controles mostraron signos ligeros de la EOA.

En cuanto a los títulos diferentes de Acs IH y SN contra el PMVP/LPM en las 2 cerdas, quizás esto se deba a una respuesta individual, ya que se han visto variaciones individuales de Acs SN, durante la preñez, en cerdas vacunadas, previo a la inseminación, contra FPC, Enfermedad de Aujeszky y Encefalitis Japonesa (19).

No obstante que la cerda No. 163, mostró títulos bajos de Acs IH (1:5) y SN (1:2) en el calostro, en el día del parto y al primer día posparto, y su suero sanguíneo fue negativo a los 6 días posparto, alcanzó a proteger al único lechón (lechón No. 100) que tuvo; aunque en éste no se detectaron Acs en su suero, probablemente hubo una muy baja transferencia de Acs IH y SN que no alcanzaron a detectarse en el suero o que también tales Acs se quedaron en el lumen intestinal; también es probable que haya habido una baja transferencia de inmunidad celular (40) presente en el calostro (14, 16); ya que este lechón no manifestó ningún signo, después del desafío. Los Acs calostrales de la cerda No. 319, al día del parto (IH de 1:5 y SN de 1:64) y al primer día posparto (IH de 1:5 y SN de 1:32), fueron similares a los encontrados en otro trabajo (6), y se transfirieron a la camada a títulos IH de 1:5 y SN de 1:4 a 1:32 (sólo uno tuvo un título SN de 1:4) y protegieron a los lechones ante el desafío. Con excepción de 2 lechones (un negativo y uno con un título SN de 1:4), los títulos de Acs SN detectados en los lechones del Experimento 1 de este trabajo sí hubieran alcanzado a protegerlos de los signos clínicos y de la letalidad ante un desafío más riguroso con el PMVP/LPM, de acuerdo a los resultados obtenidos por otra vacuna elaborada con el PMVP/POA-87, en donde se observó que títulos SN  $\geq$  1:8 alcanzaron a proteger a los lechones, ante el desafío (6).

Como era de esperarse los Acs calostrales presentes en los lechones, mostraron títulos mayores al inicio del desafío y fueron disminuyendo conforme pasó el tiempo hasta el día 23 PD y probablemente, desaparecieron poco después, antes de que el lechón empezara a mostrar su inmunidad activa. En otro trabajo se ha observado que estos desaparecen a los 28 y 38 días de edad, dependiendo de los niveles de Acs encontrados en sus madres (6, 21).

Los lechones controles desafiados que inicialmente fueron completamente negativos, empezaron a desarrollar Acs entre el día 7 y 14 PD; y al día 23 estos se elevaron a títulos IH promedio de 1:14, que

corresponderían probablemente a títulos SN iguales o mayores de 1:32.

En cuanto a la transferencia de inmunidad materna por vía del calostro a los lechones, se sabe que la protección pasiva se debe fundamentalmente a la presencia de anticuerpos contra el antígeno (32) aunque es probable que también haya una inmunidad celular ya que se ha observado que en el calostro de cerdas del total de células encontradas, el 10-25 % está constituido por linfocitos (16) y preliminarmente se sabe que estas células logran permear la pared intestinal del lechón y pueden conferir por lo tanto, una inmunidad celular en el lechón recién nacido (40). También se sabe que el 56 % de los leucocitos presentes en el calostro de cerdas, está constituido por neutrófilos polimorfonucleares y el 35 % de macrófagos, esto se invierte en la leche, ya que a los 14- 21 días el 12-14 % es de neutrófilos polimorfonucleares y el 77-80 % de macrófagos (14).

De acuerdo a los datos del Experimento 2, al realizar la prueba de potencia de la vacuna oleosa experimental contra el PMVP/LPM, después del desafío con aerosoles conteniendo el PMVP/LPM se observó que en los lechones controles, hubo una morbilidad del 100 % en el grupo inoculado con el virus sin diluir (Grupo 2A) y del 80 % en el grupo inoculado con la dilución  $10^{-2}$  (Grupo 2B); mientras que la letalidad en el Grupo 2A, fue del 100 %, a pesar de que recibieron una dosis menor ( $6 \times 10^{8.35}$ ) de la que se había establecido inicialmente para matar al 80 % ( $5.6 \times 10^{7.9}$ ) (Capítulo III); en los lechones del segundo grupo control (Grupo 2B), expuestos con  $6 \times 10^{4.35}$  DICC<sub>60%</sub>, la letalidad fue del 60 %. En otras publicaciones se menciona que se han usado dosis de 2 ml  $\times 10^{4.5}$  DICC<sub>60%</sub> por lechón, inoculándolos por las vías intratraqueal y nasal (6); y de  $10^5$  DICC<sub>60%</sub> por lechón, en la exposición por aerosoles, los cuales llegaron directamente a las cavidades oral y nasal (38), y con ambas dosis se observaron mortalidades del 100 y 75 %, respectivamente (6, 38).

En cuanto a la respuesta inmune humoral, a los 15 días después de la primera vacunación en una de las cerdas vacunadas (cerda No. 37-8) se encontraron Acs IH de 1:10 y en las 2 cerdas vacunadas (cerdas Nos. 37-8 y 52-4) se encontraron Acs SN de 1:32; en el SC (al día del parto) se encontraron Acs IH de 1:40 y 1:80, y Acs SN de 1:128 a los 26 y 27 días posteriores a la primera vacunación; estos títulos son superiores a los encontrados en otro trabajo en donde a los 15 días después de la primera aplicación de la vacuna los títulos de Acs SN fueron de 1:4 a 1:16 y en el SC (día del parto) de 1:16 a 1:64 (6).

No obstante que las 2 cerdas vacunadas (Nos. 52-4 y 37-8) del Experimento 2, mostraron los mismos títulos de Acs IH y SN el día en que fueron desafiados sus lechones, en el Cuadro 13 podrá observarse que, al comparar los títulos de Acs IH de cuatro lechones desafiados de la cerda No. 52-4 con los de otros 4 desafiados de la cerda No. 37-8 (Nos. 70 vs 83, Nos. 74 vs 85, Nos. 78 vs 88 y Nos. 79 vs 89), hay una diferencia de 2 diluciones; excepto en un par de lechones (Nos. 75 vs 87), en los que la diferencia es de una dilución; esto mismo se ve reflejado al comparar los títulos promedio de ambos grupos de lechones;

y los títulos más altos correspondieron a los lechones de la cerda No. 37-8.

En cuanto a los lechones no desafiados de ambas cerdas vacunadas, en el Cuadro 14 puede observarse que al comparar los títulos de Acs IH de un lechón de la cerda No. 52-4 con otro de la cerda No. 37-8 (Nos. 71 vs 86), se vuelve a observar que hay una diferencia de dos diluciones y el título más alto corresponde al lechón de la cerda No. 37-8.

En cuanto a la comparación de los títulos de Acs SN, entre los lechones de las 2 cerdas vacunadas (Nos. 52-4 y 37-8) del Experimento 2, sólo en 4 lechones hubieron diferencias y esto podrá observarse en el Cuadro 13, en donde se puede apreciar que en dos pares de lechones (Nos. 75 vs 87 y Nos. 79 vs 89) hay diferencias de una dilución, en un par (Nos. 70 vs 83) hay dos diluciones de diferencia, y en el cuarto y último par (Nos. 74 vs 85) hay una diferencia de 3 diluciones; al comparar los títulos promedio de Acs SN entre ambos grupos de lechones, se puede observar que hay una diferencia de aproximadamente una dilución, y el título más alto lo vuelven a mostrar los lechones de la cerda No. 37-8.

Las diferencias observadas en cuanto a los títulos de Acs IH y SN entre los lechones de ambas cerdas, no obstante que entre ellas, al día del parto, no muestran diferencias de Acs SN (1:128), aunque si una diferencia de Acs IH de una dilución (1:40 vs 1:80) y el día del desafío de sus lechones no muestran diferencias en los títulos de Acs IH y SN, quizás se deban a que la cerda No. 52-4, cuyos lechones mostraron los títulos menores de Acs, haya amamantado a 12 lechones en lugar de los 7 que amamantó la cerda No. 37-8, es decir que los lechones que mostraron los títulos de Acs más altos eran aproximadamente la mitad de los que tuvieron los títulos menores de Acs; aunque como podrá verse, las diferencias no son muy significativas.

En cuanto a los títulos de Acs SN, estimulados en la cerdas vacunadas, así como los transferidos a los lechones, los detectados en este trabajo son altos (1:16 a 1:128), al compararlos con los estimulados por otra vacuna (títulos SN de 1:4 a 1:64) (6); en donde sin embargo, se observó que los títulos de 1:8, encontrados en los lechones, los protegieron y títulos menores no. En nuestros experimentos se encontraron títulos que protegieron de la letalidad a partir de 1:16; pero en cuanto a morbilidad, justamente un lechón que tenía un título de Acs SN de 1:16 enfermó ligeramente y se recuperó.

En términos generales, se puede observar que en lo referente a la letalidad, en los lechones de las cerdas vacunadas hubo una protección del 100 %. Y en cuanto a la morbilidad, una protección del 91.7 %; mientras que ante la misma dosis de exposición enfermaron y murieron el 100 % de los controles.

#### 4.7. CONCLUSIONES.

- 1.- Se dispone de una vacuna inactivada satisfactoria que, en condiciones controladas, al ser aplicada en cerdas gestantes, les estimula la producción de anticuerpos, los cuales pasan a través del calostro, y protegen de la mortalidad al 100 % de la prole, ante un desafío que mata al 100 % de los controles.
- 2.- Se estableció la metodología para comprobar la potencia de las vacunas inactivadas contra la Enfermedad del Ojo Azul, aplicadándolas en las cerdas gestantes, y desafiando a sus lechones entre los 4 y 6 días de edad con aerosoles que contenían al PMVP/LPM.



ANEXOS 4

CUADRO 1.- ALGUNAS CARACTERISTICAS DE LAS CERDAS GESTANTES\* DEL EXPERIMENTO 1.

No. Ident	No. Parto	Días gestación **	Raza	Duración Gestación (días)
183 VACUNADA	9º	81	York puro con Hampshire	113
319 VACUNADA	9º	81	York/Landrace con York	113
323*** CONTROL	2º	81	York puro con Landrace	112

\* Cerdas cargadas en la granja porcina de la FMVZ, UAEM, El Cerrillo, Edo. de México; \*\* Día de aplicación de la primera dosis de 4 ml de vacuna y/o placebo en los jermones (14 días después recibieron la segunda aplicación del inóculo respectivo); \*\*\* Cerda control a la que sólo se le aplicó placebo.

CUADRO 2.- EXPERIMENTO 1: TEMPERATURAS RECTALES DE LOS LECHONES DE CERDAS NO VACUNADAS (GRUPO 1B) DESAFIADOS CON EL PMVP/LPM, DURANTE LOS DIAS EN QUE VARIOS DE ELLOS MOSTRARON TEMPERATURAS  $\geq$  a 40 C

TEMPERATURAS DIAS POSDESAFIO (PD)

Arete	Día 4*	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 10	Día 12
424 *	40.1	40.4	40.3	39.9	39.8	39.6	39.6
428 *	39.6	39.8	39.6	39.5	39.9	39.5	39.5
427 *	40.1	40.1	40.1	40.4	40.1	39.7	40.1
429 y	40.0	39.6	39.5	40.0	41.0	39.9	39.0
430 y	40.3	41.2	40.6	41.0	39.8	39.8	39.4
431 *	40.1	40.1	39.8	39.8	40.0	39.4	39.7
432 y	40.2	40.6	41.1	40.3	39.7	40.2	39.5

\*Durante los días previos al día 4 PD, así como en los días 9, 11 y los posteriores al día 12 PD hasta el día 15, todos mostraron temperaturas inferiores a los 40 C.

CUADRO 3.- EXPERIMENTO 1: COMPARACION DE LAS TEMPERATURAS PROMEDIO DE LOS LECHONES DE LA CERDA NO VACUNADA Y DE LAS VACUNADAS, DESDE UN DIA PREVIO HASTA 15 DIAS DESPUES DEL DESAFIO CON EL PMVP/LPM.

D/P <sup>1</sup>	LCNV <sup>2</sup>	LCV <sup>3</sup>
1	39.1	38.9
0 <sup>4</sup>	39.1	38.6
1	39.2	39.1
2	39.4	38.9
3	39.5	39.0
4	40.0	39.3
5	40.3	39.2
6	40.1	39.4
7	40.1	39.5
8	40.0	39.3
9	39.4	39.1
10*	39.7	39.5
11**	39.1	39.3
12***	39.5	39.2
13	39.3	39.2
14	39.2	39.0
15	39.3	38.9

<sup>1</sup> D/P = Días posdesafío; <sup>2</sup> LCNV = Lechones de la cerda no vacunada; <sup>3</sup> LCV = Lechones de las cerdas vacunadas; <sup>4</sup> 0 = Día del desafío; \* lechones: No. 432 (LCNV) y No. 90 (LCV) con temperaturas de 40.2 C, cada uno; \*\* LCV No. 100, con temperatura de 40.3; \*\*\* LCNV No. 427, con temperatura de 40.1 C, y LCV No. 100, con temperatura de 40.0 C.

CUADRO 4. EXPERIMENTO 1: LECHONES DE LA CERDA NO VACUNADA, DESAFIADOS CON EL PMVP/LPM, QUE MOSTRARON TEMPERATURAS  $\geq$  A 40 C POR DOS PERIODOS.

DÍAS POSDESAFIO

No.	4	5	6	7	8	9	10	11	12
427	40.1	40.1	40.1	40.4	40.1	39.6	39.7	39.5	40.1
429	40.0	39.8	39.5	40.0	41.0	39.1	39.9	38.9	39.0
431	40.1	40.1	39.8	39.8	40.0	39.4	39.4	38.3	39.7
432	40.2	40.8	41.1	40.3	39.7	39.6	40.2	39.3	39.5

Lechones de cerdas vacunadas que mostraron temperaturas  $\geq$  a 40 C: No. 90 con 40.2 C, día 10 P.D.; No. 100 con 40.3 y 40.0 C, días 11 y 12, respectivamente.

CUADRO 5.- PERIODO POSDESAFIO\*, DURANTE EL CUAL LOS LECHONES DE LA CERDA CONTROL, DEL EXPERIMENTO 2 (GRUPO 2A), MOSTRARON ALGUNA ALTERACION EN SU TEMPERATURA RECTAL.

D/PI	TEMPERATURA DE LOS LECHONES Nos.:				
	39.º	64.º	65.º	66.º	67.º
1	39.9	39.8	39.9	39.8	40.3
2	40.2	40.0	40.3	40.6	40.0
3	40.0	39.7	39.9	40.3	39.9
4	40.4	40.1	39.9	39.9	40.2
5	40.5	40.5	39.9	40.7	40.6
6	40.4	39.7	39.5	39.4	39.3
7	39.3	38.4	38.8	38.4	38.6
8	<u>35</u>	38.6	37.8	<u>35.8</u>	<u>34.5</u>
9	<u>35</u>	RIP	38.2	RIP	<u>34.1</u>
10	RIP**		38.6		<u>32</u>
11			<u>37.4</u>		RIP
12			RIP		

\* LCC = Lechones de una cerda control No. 40-13, inoculados con  $30 \times 10^{25}$  DICC<sub>90h</sub>/PMVP/LPM; \*\*RIP = muerto a causa del PMVP/LPM; D/PI = Días posinoculación

CUADRO 6.- EXPERIMENTO 2: PERIODO POSDESAFIO DURANTE EL CUAL CUATRO DE LOS CINCO LECHONES DE LA CERDA CONTROL\* (GRUPO 2B), MOSTRARON LIGERA ELEVACION EN SU TEMPERATURA RECTAL.

D/PI	TEMPERATURA DE LOS LECHONES (Nos.)				
	22v	27v	29v	68v	69v
2	39.2	39.9	39.6	40.1	39.4
3	40.0	39.7	39.3	39.9	39.4
4	39.7	39.9	39.9	39.8	39.9
5	39.1	40.0	39.9	39.5	39.8
6	39.3	39.2	39.0	39.6	39.7
7	38.5	38.8	39.3	39.3	38.7
8	39.9	40.0	RIP	40.0	39.3
9	38.0	39.7		39.7	40.0
10	38.4	39.7		38.6	40.0
11	37.9	37.3		38.3	39.9
12	37.5	<35		39.1	39.8
13	<37.6	<35RIP		38.8	39.6
14	<37.6			38.9	39.1
15	<37.6			38.7	39.0
16	<37.6			38.6	39.6
17	<37.6*			39.3	39.4
18	38.5			39.4	39.1
19	RIP			**	**

\* Lechones de la cerda control No. 40-13, desafiados con 30 ml X 10<sup>12</sup> DICC/PMVP/LPM; \*\* Del día 19 en adelante ya no se registraron las temperaturas rectales; RIP = muerte a causa del PMVP/LPM; D/PI = Días posinoculación.

CUADRO 7.-EXPERIMENTO 1 PRESENTACION GLOBAL DEL INICIO Y DURACION DE LOS SIGNOS CLINICOS OBSERVADOS EN LOS LECHONES DE LA CERDA CONTROL NO VACUNADA DESAFIADOS CON EL PMVP/LPM.

SIGNOS CLINICOS	DIAS POSDESAFIO (PD)							
	4	5	6	7	8	9	10	11
Amontonamiento	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7			
x frec resp* /min (todos)	59 vs 44			48 vs 34				
Pelo hirsuto				4/7	4/7			
Tlalismo				4/7				
Conjunt/lagañas					7/7	7/7	3/7	
Somnolencia					7/7	7/7	4/7	
OC					1/7	1/7	1/7	
Torticollis**						1/7	1/7	1/7

\* Frecuencia respiratoria normal en lechones de esta edad (9-18 Kg) = 25-40 resp/min; \*\* El lechón No. 429 mostró: atonía, blefaritis, torticollis hacia el lado derecho y caminaba dando vueltas hacia su lado izquierdo, durante los días 9, 10, 11 y 12 PD; el día 8 PD, 3 lechones de cerdas vacunadas mostraron lagañas.

CUADRO 8.- EXPERIMENTO 1: TITULOS DE ANTICUERPOS IH Y SN EN EL SUERO SANGUINEO (SS) Y CALOSTRAL\* (SC) DE LAS CERDAS VACUNADAS Y LA CONTROL.

DP/ DPP/E DAD	0		1		2		6		14		21		30	
DPDL	-6		-5		-4		-1		7		14		23	
DPPV	32		33		34		38		46		53		62	
No.	IH	SN	IH	SN	IH	SN	IH	SN	IH	SN	IH	SN	IH	SN
163	5 <sup>a</sup>	2	5 <sup>b</sup>	2	5 <sup>c</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	NT
319	5 <sup>a</sup>	64	5 <sup>b</sup>	32	NM	NM	5	18	10	18	5	32	5	NT
323	5 <sup>b</sup>	-	NM	NM	NM	NM	-	-	-	-	-	-	-	NT

IH = Inhibición de la hemaglutinación, SN = Seroneutralización; Los títulos IH y SN se expresan como la recíproca de la última dilución del suero en donde se observó una IH y/o una SN completa del PMVP/LPM; DP/DPP/EDAD = Día del parto y/o días posparto; EDAD; DPDL = Días pre y posdesaño de los lechones, DPPV = Días posteriores a la primera vacunación (cerdas 163 y 319), y de la aplicación del placebo (cerda 323); <sup>a</sup> Muestra de suero calostroal (SC) colectada el día del parto; <sup>b</sup> Muestra de SC colectada un día después del parto; <sup>c</sup> Muestra de SC colectada dos días después del parto; NM = No muestreado; NT = No trabajado; El día 38 DPPV, y en los siguientes muestreos sólo se obtuvo SS.



CUADRO 9.- EXPERIMENTO 1: TITULOS DE ANTICUERPOS IH\* Y SN<sup>1</sup> EN LECHONES, DESAFIADOS CON EL PMVP/LPM, DE CERDAS VACUNADAS.

TITULOS DE ANTICUERPOS IH Y SN EN LECHONES DE CERDAS VACUNADAS

DP/DPP/E DAD <sup>b</sup>	6		14		21		30	
DPDL <sup>b</sup>	-1		7		14		23	
DDPV <sup>b</sup>	38		46		53		62	
EDAD/ DIAS	6		14		21		30	
No.	IH	SN	IH	SN	IH	SN	IH	SN
90 ♀	-	16	-	4	-	2	-	2
91 ♀	-	4	-	2	- <sup>c</sup>	2 <sup>c</sup>		
92 ♀	5	32	-	8	-	8	-	4
93 ♀	5	32	-	8	-	8	-	4
95 ♀	5	16	-	8	-	8	-	4
96 ♀	5	16	S <sup>d</sup>	32	-	4	-	4
97 ♀	5	32	-	8	-	8	-	NT <sup>e</sup>
99 ♂	5	16	-	8	-	8	-	NT
100 ♂	-	-	-	-	-	2	-	NT
433 ♂	-	16	-	4	-	4	-	NT
TP <sup>f</sup>	5	20	-	9	-	6	-	3.8

\* IH = Inhibición de la hemaglutinación. SN = Seroneutralización, que se expresan como la recíproca de la última dilución del suero en donde hubo una completa IH y/o SN del PMVP/LPM; <sup>b</sup> DP/DPP/EDAD = Día del parto y/o días posparto; EDAD; DPDL = Días pre o posdesaño de los lechones; DDPV = Días posteriores a la primera vacunación; <sup>c</sup> Muerto accidentalmente por choque eléctrico (día 12 posdesaño); <sup>d</sup> S = sospechoso; <sup>e</sup> NT = no trabajado; <sup>f</sup> TP = Títulos promedio

CUADRO 10.- EXPERIMENTO 1: DETERMINACION DE LOS TITULOS DE ANTICUERPOS IH<sup>a</sup> Y SN<sup>a</sup> EN 7 LECHONES, DE LA CERDA CONTROL, DESAFIADOS CON EL PMVP/LPM, Y EN 2 LECHONES CONTROLES SEPARADOS NO DESAFIADOS.

DPDL <sup>b</sup>	-1		7		14		23	
DPPV <sup>b</sup>	38		46		53		62	
EDAD	7 DIAS		15 DIAS		22 DIAS		31 DIAS	
No.	IH	SN	IH	SN	IH	SN	IH	SN
424 ✓ LCC-D	-	-	-	-	S <sup>c</sup>	4	10	NT <sup>d</sup>
425 ✓ "	-	-	-	-	S	4	20	NT
427 ✓ "	-	-	-	-	-	4	10	NT
429 ✓ *	-	-	-	-	S	4	10	NT
430 ✓ "	-	-	-	-	-	2	10	NT
431 ✓ "	-	-	-	-	S	4	20	NT
432 ✓ "	-	-	-	-	5	8	20	NT
426 ✓ <sup>e</sup>	-	-			-	-		NT
428 ✓ <sup>e</sup>	-	-	-	-				NT
TP <sup>f</sup>						4	14	NT

<sup>a</sup> IH = Inhibición de la hemaglutinación y SN = Seroneutralización, que se expresan como la recíproca de la última dilución del suero en donde hubo una completa IH y/o SN del PMVP/LPM; <sup>b</sup> DPDL = Días pre y/o posdesafío de los lechones; DPPV = Días posteriores a la primera vacunación; <sup>c</sup> S = sospechoso; <sup>d</sup> NT = No trabajado; <sup>e</sup> Lechones controles que fueron mantenidos separados; <sup>f</sup> TP = Titulos promedio; LCC-D = Lechones de la cerda control, desafiados con el PMVP-LPM.

CUADRO 11.- EXPERIMENTO 2.- TITULOS DE ANTICUERPOS SN E IH EN EL SUERO SANGUINEO Y CALOSTRAL, ANTES Y AL DIA DEL PARTO, DE 2 CERDAS VACUNADAS Y UNA CONTROL

No. CERDA	1ª VACUNACION SUERO SANGUINEO (DIA 0)		2ª VACUNACION SUERO SANGUINEO (DIA 15)		SUERO CALOSTRAL (D/PARTO) 26 Y 27 DPPV <sup>b</sup>	
	PRUEBAS DE SN <sup>c</sup>	IH <sup>e</sup> Y	IH	SN	IH	SN
52-4/VAC	(-)		(-)	1:32	1:40	1:128
37-8/VAC	(-)		1:10	1:32	1:80	1:128
40-13/ CONT <sup>d</sup>	(-)		(-)	(-)	NT <sup>e</sup>	(-)

<sup>a</sup> Primera vacunación 4 ml, segunda vacunación 4 ml;

<sup>b</sup> DPPV = Días posteriores a la primera vacunación (cerda 52-4/26 DPPV y cerda 37-8/27 DPPV); <sup>c</sup> IH = Inhibidores de la hemaglutinación; SN = Seroneutralizante; <sup>d</sup> Cont = control; <sup>e</sup> NT = No trabajado

CUADRO 12.- EXPERIMENTO 2: TITULOS DE ANTICUERPOS SN\* E IH<sup>o</sup>, EL DIA DEL DESAFIO CON EL PMVP/LPM, EN LAS CERDAS VACUNADAS CONTRA LA EOA Y EN SUS LECHONES ANTES DEL DESAFIO

CERDA No. 52-4 TITULO ACS. (32 DPPV) SN: 1:64 / IH: 1:10			CERDA No. 37-8 TITULO ACS. (31 DPPV) SN: 1:64 / IH: 1:10		
LECHONES No. Y SEXO (6 días de edad)	TITULO ACS.		LECHONES No. Y SEXO (4 días de edad)	TITULO ACS.	
	IH	SN		IH	SN
20 ♂	1:10	1:32	83 ♂	1:40	1:128
73 ♂	1:5	1:32	84 ♂	NT <sup>b</sup>	NT
74 ♂	1:5	1:16	85 ♀	1:20	1:128
75 ♂	1:10	1:64	87 ♂	1:20	1:128
78 ♂	1:5	1:128	88 ♂	1:20	1:128
79 ♀	1:5	1:64	89 ♀	1:20	1:128
TP <sup>c</sup>	1:6.6	1:56	TP	1:24	1:128

\* IH = Inhibidores de la hemaglutinación, SN = Seroneutralizantes; <sup>b</sup> NT = No trabajado; <sup>c</sup> TP = Títulos promedio.

CUADRO 13.- EXPERIMENTO 2: TITULOS DE ANTICUERPOS SN<sup>a</sup> E IH<sup>a</sup>, EL DIA DEL DESAFIO CON EL PMVP/LPM, EN LECHONES NO DESAFIADOS DE CERDAS VACUNADAS CONTRA LA EOA.

CERDA No. 52-4 (LECHONES 6 DIAS/EDAD)			CERDA No. 37-8 (LECHONES 4 DIAS/EDAD)		
LECHON No. Y SEXO	TITULO		LECHON No. Y SEXO	TITULO	
	IH	SN		IH	SN
71 ♀	1:10	1:128	86 ♀	1:40	1:128
72 ♀	1:5	1:64			
76 ♂	1:10	1:64			
77 ♀	1:5	1:64			
80 ♀	1:5	1:64			
82 ♀	1:10	1:64			
TP <sup>b</sup>	1:7.5	1:74	TP	1:40	1:128

<sup>a</sup> SN = Sero-neutralizantes, IH= Inhibidores de la Hemaglutinación, <sup>b</sup> TP = Titulos promedio.

CUADRO 14.- TITULOS DE ACS, IH Y SN Y EL NUMERO DE LECHONES QUE LO MOSTRARON ASI COMO EL PORCENTAJE RESPECTIVO, DE UN GRUPO DE 18 LECHONES DE 2 CERDAS VACUNADAS CONTRA LA EOA.

No. de lechones	%	TSN*	No. de lechones	%	TIH*
1	5.5	1:16	7	39	1:5
2	11.1	1:32	5	28	1:10
7	39.0	1:64	4	22	1:20
8	44.4	≥ 1:128	2	11	1:40

\* TSN = Titulo seroneutralizante, TIH = Titulo de inhibición de la hemaglutinación

#### 4.8. LITERATURA CITADA.

- 1.- Campos H., R y Carbajal S., M., 1992. Trastornos reproductivos en los sementales de una granja porcina de ciclo completo ante un brote de ojo azul. En: Morilla G., A (ed.) Avances en Producción Porcina. México. 1:243-250.
- 2.- Colmenares V., G. Evaluación de la inmunidad conferida por extractos proteicos de Haemophilus Pleuropneumoniae, mediante desafío experimental. Tesis Maestría. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, México, D.F., 1990.
- 3.- Correa-Girón, P.; Martínez L., A.; Ericsson, A.; and Moreno-López J. Characterization of a paramyxovirus isolated from the brain of a piglet in Mexico. Procc. of the 9th IPVS Congress. Barcelona, Spain, 1986:205.
- 4.- Correa-Girón, P.; Martínez L., A.; Rosales E., F. Presence of porcine paramyxovirus (PPMV) antibodies in pig sera from Mexico collected before 1980. In: First International Symposium upon pig paramyxovirus, Puebla, Méx. 1994:11.
- 5.- First International Symposium upon Pig Paramyxovirus. Puebla. Pue., México. Nov., 21, 22 and 23, 1994.
- 6.- Fuentes R., J.M. Evaluación de una vacuna experimental contra ojo azul en cerdos mediante las pruebas de inmunogenicidad, inocuidad, potencia y medición de la inmunidad pasiva en lechones. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 1993:30.
- 7.-Fuentes R., M.; Carreón N., R.; Ramírez M., H.; Trujillo, M. E.; De Fraire, I.B. Estudio piloto de la frecuencia de anticuerpos contra el paramyxovirus del ojo azul en cerdos de la República Mexicana. Veter. Méx., 1992(XXIII):37-39.
- 8.- García G., J.; Camacho M., J.; Mendoza E., S.; Ciprian C., A.; González G., S.; Díaz, C.; Stephano H., A. Infección experimental con el virus de ojo azul y Pasteurella multocida en cerdos convencionales. En XXIII Cong. Nal. AMVEC, 1988:87-89.
- 9.- Galina P., L.; Martínez L., A.; Correa G., P.; Colinas T., A.; Anaya E., A. M.; Aguilar R., F.; Ramírez N., R. Transmisión experimental del Paramyxovirus Porcino de La Piedad Michoacán (PP-LPM) en cerdos. En Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. México, D.F. 1989:84.

- 10.- Guillén A., H.; Barba L., R. Estudio de un brote de una nueva enfermedad denominada síndrome del ojo azul en porcinos. En: AMVEC, Mazatlán, Sin., México, 1984:100-101.
- 11.- Hernández-Jáuregui, P.; Sundqvist, A.; Fuentes, M.; Díaz O., A.; Reyes L., J.; Hernández B., E.; Moreno-López, J. Correlación entre las pruebas de virus (neutralización, inhibición de la hemoaglutinación y ELISA en sueros vacunales y de brote para anticuerpos contra el paramixovirus del síndrome del ojo azul en cerdos. *Vel. Méx.*, 1992(XXIII):217-222.
- 12.- Hernández-Jáuregui, P.; Díaz-ore, A.; Reyes-Leyva, J.; Hernández-Baumgarten, E.; Moreno-López, J. Desarrollo y evaluación de una vacuna experimental contra el paramixovirus porcino. In First International Symposium upon Pig Paramixovirus, Puebla, México, 1994:30-40.
- 13.- Hessel, H.; Ellsworth, S.; Couture, L.; Jayappa, H.; and Dickinson, E. Induction of lactogenic immunity against neonatal rotavirus diarrhea in swine. In: IPVS (ed.) *Procc. International Pig Veterinary Society 10th Congress. Chap. IV Viral Infections. August 14-17, Rio de Janeiro Brazil, 1988:217.*
- 14.- Hurley, W.L.; and Grieve, R.C.J. Total and differential cell counts and N-acety-beta-D-glucosaminidase activity in sow milk during lactation. *Veterinary Research Communications 1988:12(2-3):149-153.*
- 15.- Iglesias, G.; Rincón R., F.; Vásquez, B.; Tapia, J.; Domínguez F. Evaluación de una vacuna para la prevención de la enfermedad causada por el paramixovirus porcino. In: First International Symposium Upon Pig Paramyxovirus, Puebla, México, 1994:43-44.
- 16.- Jan C. le. A study by flow cytometry of lymphocytes in sow colostrum. *Rosearch y Veterinary Science (1994)57(3):300-304.*
- 17.- Kennedy, S.; Carroll, B.; McConnell, S.; Herron, B.; McNeilly, F.; Allan, G.; Walker, I.; Adair, B.; hernández-Jáuregui, P.; Linne, T. Experimental LPM paramyxovirus infection in pigs: histological and immunohistochemical findings. In: First International Symposium Upon Pig Paramyxovirus, Puebla, México, 1994:51.
- 18.- Kolb, E. La regulación térmica. En: Kolb, E. (ed.). *Fisiología veterinaria (II). 2ª. ed. España: Acribia, 1976:728.*



- 19.- Lai, S.S.; Lai, L.Y.; and Ho, W.C. Changes of antibody levels in sows influenced by pregnancy. *Journal of the chinese society of veterinary science*. 1989,15:4:327-333.
- 20.- Martínez L., A.; Correa G., P.; Fajardo M., R.; Garibay S., M. Aislamiento y estudio de un virus porcino parecido a los paramixovirus. En Correa G P, Morilla G A (eds.) Encuentro sobre enfermedades infecciosas del cerdo. México, D.F. 1985:15-21.
- 21.- Martínez L., A.; Correa G., P.; Rosales E., F.; Vásquez P., C.; Garibay S., M. Curva de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación (IH) contra el paramixovirus porcino de La Piedad, Michoacán (LPM), en cerdos de una granja de ciclo completo. *Tec. Pec. Méx.* 1987(25)2:163-167.
- 22.- Martínez L., A.; Colinas T., A.; Correa G., P.; Ramírez N., R.; Garibay S., M.; Coss, M.; Báez, A.; Coba A., M.A. Determinación de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación contra el paramixovirus LPM en cerdos con signos nerviosos, con y sin opacidad de córnea. En: II Cong. ALVEC; XXII Conv. AMVEC; III Enc. UNPC. Acapulco, Méx. 1987.
- 23.- Martínez L., A.; Correa G., P.; Colinas T., A.; Galina P., L. Opacidad corneal bilateral congénita en lechones de cerdas expuestas al Paramixovirus porcino de La Piedad, Michoacán. En: XXIV Cong. Nal. AMVEC-89, Morelia, Mich., México, 1989:56-58.
- 24.- Martínez L., A.; Correa G., P.; Coba A., M.A.; Zamora G., J. Advances in the evaluation of a experimental vaccine against porcine Paramixovirus (PPMV). In: First International Symposium upon Pig Paramyxovirus. Puebla, Méx. 1994:41.
- 25.- Moreno-López, J.; Correa-Girón, P.; Martínez L., A. y Ericsson, A., 1988. Characterization of a Paramixovirus isolated from the brain of a piglet in Mexico. *Arch Virol* 91:221-231.
- 26.- OIRSA. SARIH-CANIFARMA. Manual de Requisitos Mínimos de Productos Biológicos Veterinarios México, Guatemala, El Salvador, Honduras, Nicaragua, Costa Rica, Panamá y República Dominicana, 1991.
- 27.- OMS. Bases técnicas para la legislación referente a los alimentos irradiados. Informe de un Comité Mixto FAO-OIEA-OMS, de expertos. Serie de informes técnicos No. 316. Ginebra, Suiza. 1966:

- 28.- Pallares C., R.; Fajardo M., R.; Martínez L., A.; Correa-Girón, P.; Coba A., M.A.; Zamora E. J.L. Alteraciones histológicas en lechones inoculados con diferentes dosis del Paramixovirus Porcino (PMVP). *Vet. Méx. Supl.* 95(26):122.
- 29.- Pérez P., F.; Stephano H., A.; Gay G., M. Estudio histológico en lechones inoculados experimentalmente con el paramixovirus de ojo azul. En: *Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos* (eds.). XXIII Congreso Anual AMVEC, León, Gto., México, 1988:81-83.
- 30.- Ramírez N., R.; Martínez L., A.; Correa G., P.; Colinas T., A. Un brote de paramixovirosis encefalítica en cerdos de una granja del estado de México. En: *Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos* (eds.). II Congreso ALVEC, XII Convención AMVEC y III Encuentro UNPC, Acapulco, Gro., México, 1987:64-67.
- 31.- Ramírez M., H.; Nápoles R., C.; Ruiz S., L.; Mercado G., C.; Guerrero D., J.; y Hernández-Jáuregui, P. Patogénesis de la cepa del paramixovirus porcino PAC-3 en el aparato reproductor del cerdo. II Lesiones macro y microscópicas. In: *First International Symposium Upon Pig Paranyxovirus*. Puebla, México, 1994:49.
- 32.- Roth, J.A. Immune system. In: Straw, B.E. (ed.). *Diseases of swine (Anatomy, physiology, and Systemic pathology)*. USA, Iowa State University Press 1992:21-39.
- 33.- Stephano H., A. Gay G., M., 1985. Síndrome del ojo azul en cerdos. En: *Encuentro Sobre Enfermedades Infecciosas del Cerdo*. P. Correa y A. Morilla (eds.). México, D.F. 1985:1-13.
- 34.- Stephano H., A.; Gay G., M.; and Ramírez T., C. Encephalomyelitis reproductive failure and corneal opacity (blue eye) in pigs associated with paramixovirus infection. *Vet. Rec.* 1988(122):6-10.
- 35.- Stephano H., A.; Gay G., M.; Ramírez T., C.; Maqueda A., J.J. Estudio de un brote de encefalitis en lechones por un virus hemaglutinante. En: *Asociación Mexicana de Veterinarios especialistas en Cerdos* (eds.) XVII Convención AMVEC, Ixtapa, Guerrero, México, 1981.
- 36.- Stephano H., A.; Gay G., M.; Ramírez T., C.; Maqueda A., J.J. An outbreak of encephalitis in piglets produced by an hemagglutinating virus. *Procc. of The 7th IPVS Congress*. México, D.F., 1982:153.

- 37.- Stephano H. A.; Gay G., M. Experimental studies on a new viral syndrome in pigs called 'blue eye', characterized by encephalitis and corneal opacity. In: 8th International Pig Veterinary Society Congress, Ghent, Belgium, 1984; chap II:71.
- 38.- Stephano H., A. Eficacia de una vacuna inactivada para el control del paramixovirus de ojo azul en lechones inoculados experimentalmente. En: CANIFARMA (eds.), *Industria Farmacéutica Veterinaria; Premio Canifarma*, 1991(1):35-45.
- 39.- Straw, B.E.; Meuten, D.J. Physical examinations. In: Leman, A.D.; Straw, B.; Glock, D.R.; Mengeling, W.L.; Penny, R.H.C.; Scholl, E. (eds.) *Diseases of swine*, 6th ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 1986:202.
- 40.- Tuboly, S.; Bernath, S.; Glavits, R.; Medveczky, I. Intestinal absorption of colostral lymphoid cells in newborn piglets. *Veterinary immunology and immunopathology*, 1988, 20(1):75-85.
- 41.- Weller, M.W.; Horstman, M.P.; Chambers, D.M.; and Welter, C.J. Importance of serogroup C rotavirus infections in pigs and methods for their control. In: IPVS (ed.) *Procc. I (Viral disease) International Pig Veterinary Society 12th Congress*. The Hague, The Netherlands, August 17-20, 1992:90.
- 42.- Zamora G., J.; Martínez L., A.; Correa G., P.; Colinas T., A. Estudio preliminar en cerdos de dos vacunas inactivadas experimentales elaboradas con el paramixovirus porcino de La Piedad Michoacán. En: AMVEC (eds.), *XXV Congreso Nacional AMVEC*. Puerto Vallarta, Jal., México, 1990:61-64.

## CONCLUSIONES

De acuerdo a los datos obtenidos, en los experimentos realizados en la presente tesis, podemos mencionar que:

- 1.- se cuenta con una vacuna inactivada oleosa antigénica, contra la EOA, elaborada a base del PP-LPM, que: i) estimula títulos altos de anticuerpos con una duración mínima de 140 días, en lechones vacunados y desafiados; desafortunadamente mostró algunos efectos indeseables en el sitio de aplicación, lo cual, de acuerdo a la literatura consultada, era de esperarse. Por otro lado, el desafío actuó como un refuerzo en los vacunados; mientras que en los controles, sólo actuó como un estímulo antigénico, ya que respondieron rápidamente con anticuerpos. ii) al ser aplicada en cerdas gestantes, les estimula la producción de anticuerpos, los cuales pasan a través del calostro, y protegen de la morbilidad al 100 % de la prole, ante un desafío que mata al 100 % de los controles.
- 2.- Se cuenta con un virus de desafío, capaz de matar al 80 % - 100 % de los lechones de 7 días de edad, cuando éstos son inoculados con aerosoles conteniendo la dosis adecuada del PMVP/LPM. Con esto, se estableció una metodología para comprobar la potencia de las vacunas inactivadas contra la Enfermedad del Ojo Azul, al aplicarse en las cerdas gestantes, y desafiando a sus lechones entre los 4 - 7 días de edad con aerosoles, dentro de una cámara.

#### ABREVIATURAS UTILIZADAS

Acs = Anticuerpos  
BEK = Bovine embrion kidney  
BHK-21 = Baby hamster kidney - 21  
CB = Cornete de bovino  
CENID-M = Centro Nacional de Investigaciones en Microbiología Veterinaria.  
CK = Cat kidney  
DICC = Dosis Infectantes para Cultivos Celulares  
DD = Día del desafío  
DSS-GPAA = Geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (electroforesis en)  
ECP = Efecto citopático  
ELISA = Enzyme linked immunosorbent assay  
ENC = Enfermedad de Newcastle  
EP = Embrión (es) de pollo  
F = Fusión (proteína de)  
GMK = Green monkey kidney  
HA = Hemaglutinante (s)/ hemaglutinación  
HAD = Hemadsorbente / hemadsorción  
HN = Hemaglutinina-neuraminidasa (proteína de)  
IH = Inhibición (inhibidores) de la hemaglutinación  
IM = Intramuscular  
IC = Intracerebral  
IN = Intranasal  
INIFAP = Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias  
IT = Intratraqueal  
IV = Intravenosa  
K = Kilodaltons  
LCV = Lechones de cerdas vacunadas  
LPM = La Piedad Michoacán  
M = Matriz (proteína de)  
MEM = Minimun essential medium  
MDBK = Madin-Daybirshire bobline kidney

NP = Nucleoproteína  
OC = Opacidad Corneal  
ORF = Open Reading Frame/ Marco de lectura abierto  
P = Phosphoprotein/ proteína fosforilada  
PCR = Polymerase Chain Reaction/ Reacción en cadena de la polimerasa  
PD = Posdesafío  
PI = Posinoculación  
Pk-15 = Pig kidney - 15/ Riñón de cerdo (línea celular continua)  
PMVP = Paramixovirus porcino  
POA = Paramixovirus de ojo azul  
PP-LPM = Paramixovirus porcino de La Piedad, Michoacán  
SARH = Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos  
SC = Subcutánea  
SN = Seroneutralización (prueba de) y/o seroneutralizantes (Acs)  
SNC = Sistema Nervioso Central  
SOA = Síndrome del Ojo Azul  
SS = Suero sanguíneo  
SV5 = Simian Virus type 5/ Virus del Simio tipo 5  
TB = Testículo de bovino  
TC = Testículo de cerdo (línea celular continua)  
TL = Tubos de Leighton  
UNAM = Universidad Nacional Autónoma de México  
VENC = Virus de la Enfermedad de Newcastle  
VPIB-3 = Virus de la parainfluenza bovina tipo 3  
VPI-3 = Virus de la parainfluenza tipo 3  
VSOA = Virus del Síndrome del ojo azul