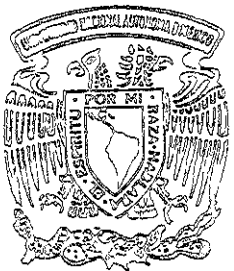


11661



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

Evaluación de la inmunotransferencia para diferenciar
los anticuerpos contra la fiebre porcina clásica
(FPC), estimulados por una vacuna
y por un virus virulento.

T E S I S
Que para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS
(Area Microbiología)

P r e s e n t a
M.V.Z. MARIA ANTONIA COBA AYALA

Directores:

Dr. Susana E. Mendoza Elvira

M.V.Z. M.A. Pablo Correa Cirón

Dr. Abel Ciprian Carrasco

Coasesor: Q.F.B. M.C. Edgar Aguilera Gerón

Cuatitlán Izcalli, Edo. de México, 2000



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Virología de la Facultad de Estudios Superiores, Cuautitlán, UNAM, con apoyo financiero del Proyecto CONACYT No. 1082 P-B, Cátedra Afecciones Bacterianas y Virales del Cerdo y Enfermedades Respiratorias del Cerdo, Becario No. 93885; y en el CENID-Microbiología, INIFAP, SAGAR, bajo la asesoría de la Dra. Susana Mendoza Eivira, Dr. Abel Ciprián Carrasco y el M.V.Z., M.A. Pablo Correa Girón.

ÍNDICE

	Página
AGRADECIMIENTOS	1
RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVO GENERAL	25
OBJETIVOS PARTICULARES	25
MATERIALES Y MÉTODOS	26
RESULTADOS	33
DISCUSIÓN	56
CONCLUSIONES	68
REFERENCIAS	101

AGRADECIMIENTOS

- Agradezco sinceramente a los MVZ, Horacio Lara, Erika Torres, Jorge Tórtora, Ataio Martínez Lara, Laura Zapata Salinas, y al QFB Oscar Torres y Edgar Romero, por su gran ayuda.
 - Al MVZ David Trujillo, especialmente, por todo su valioso tiempo para concluir este trabajo.
 - Al MVZ, MC Carlos González Silva, y al personal de apoyo de los Laboratorios del Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal (CENASA), de Santa Ana Tecamac, por su gran apoyo en las pruebas de serología.
 - A los Laboratorios Litton de México, por la donación de la cepa vacunal PAV-250.
 - A los señores Martín Cruz Sosa y Esteban García García, por toda su ayuda en el trabajo experimental.
 - Y muy especialmente a mis asesores, Dr. Susana Mendoza Elvira, Dr. Abel Ciprián Carrasco y al Dr. Pablo Correa Girón, por sus observaciones, tiempo y dedicación para poder concluir exitosamente el presente trabajo.
- A mis padres con mucho cariño, por todo el apoyo, comprensión y palabras de aliento para luchar contra toda adversidad. Y a todos mis hermanos por su ayuda y cariño.

RESUMEN.

El objetivo fue investigar si mediante las pruebas de electroforesis (EF) e inmunotransferencia (IT) se observan o no diferencias entre las proteínas de la cepa vacunal PAV-250 y la virulenta ALD de Fiebre Porcina Clásica (FPC). Primero se determinó la dilución del virus ALD capaz de inmunizar a los cerdos, sin que murieran; lo cual sirvió para preparar el suero inmune contra esta cepa. Se utilizaron cerdos de 45 días de edad, seronegativos a la FPC; formando 5 grupos: Grupo I, control con 4 cerdos; Grupo II, vacunados con PAV-250, integrado con 4 cerdos y 2 cerdos centinelas en contacto; Grupo III, inoculados con ALD, con 4 cerdos y 2 centinelas; Grupo IV, vacunados con una dosis de PAV-250 y 10 días después expuestos con ALD, con 4 cerdos y 2 centinelas; Grupo V, vacunados con dos dosis de PAV-250 y 10 días después expuestos con ALD, con 4 cerdos y 2 cerdos centinelas. El experimento duró 30 días. El día 10 postvacunación se aplicó (IM) un ml de la cepa ALD a los Grupos III, IV y V (diluida $10^{-4.0}$ /ml). A los centinelas no se les aplicó ningún tratamiento. Diariamente los cerdos se observaron clínicamente, y fueron sangrados para obtener suero sanguíneo, cada 5 días, hasta el día 30 en que se sacrificaron, y se realizó la necropsia. Para las pruebas de EF, se utilizaron los virus PAV-250 y ALD, medio de cultivo solo (MEM-GIBCO), células PK-15 (no inoculadas, lisadas y sonicadas) y suero fetal bovino (SFB, GIBCO); se realizaron en geles de poliacrilamida al 12.5 %, tñiendo con nitrato de plata. En las IT, las cepas PAV-250 y ALD se corrieron geles de poliacrilamida al 12.5 %; transfiriendo las proteínas a papel de nitrocelulosa. Para las IT se usaron los 7 muestreos de sueros obtenidos de cada grupo. El Grupo I y el Grupo II permanecieron clínicamente normales. Los Grupos IV y V, casi sin signos, pero con ligeras lesiones de FPC a la necropsia; uno de sus centinelas murió, y los demás con escasas lesiones de FPC. Los inoculados (Grupo III), presentaron signos y lesiones de FPC y sólo logró sobrevivir uno. En las pruebas serológicas, todos los cerdos inicialmente fueron seronegativos al virus (V)FPC; el Grupo I fue seronegativo durante todo el experimento; en el resto de los grupos se lograron obtener los sueros inmunes, los anticuerpos se detectaron a partir del día 15 y 25 del experimento, con títulos $\geq 1:10$. Los centinelas fueron seronegativos. En las pruebas de EF se observaron bandas de proteínas pertenecientes al VFPC; las proteínas diferentes fueron en la PAV-250, de 87, 77, 64, 41 y 23 k μ ; y para la cepa ALD las proteínas de 206, 98, y de 36 k μ . En las pruebas de IT, los sueros inmunes de los diferentes grupos (II, III, IV y V), mostraron que las proteínas diferentes del Ag-PAV-250 con respecto al Ag-ALD, fueron las de 169 y 135 k μ . El mejor reconocimiento fue durante los días 20 y 25 del experimento. Y las proteínas del Ag-ALD, que fueron distintas a las del Ag-PAV-250, fueron las de 238, 206, 78, 77, 65, 61, 52, 50, 41, 39, 35 y 32 k μ ; y el mejor reconocimiento fue en los días 20 y 30. También se detectaron frecuentemente proteínas, en los grupos de cerdos (II, III, IV y V), no reportadas en la literatura, para el Ag-PAV-250, y fueron las proteínas de 134 y 72 k μ y para el Ag-ALD las proteínas de 223, 218, 200, 190, 188, 175, 157, 154, 132, 109, 102 y 72 k μ . Los sueros obtenidos de los grupos reaccionaron contra un mayor número de proteínas con la cepa ALD, que con la cepa PAV-250. La técnica de inmunotransferencia permitió detectar diferentes proteínas entre las cepas en estudio; aunque se recomienda realizar estudios posteriores con otras cepas de campo, para corroborar los resultados obtenidos.

1.- INTRODUCCIÓN.

Desde la aparición de la Fiebre Porcina Clásica (FPC) en los EUA esta enfermedad ha sido una de las que más pérdidas económicas ha provocado a la porcicultura mundial, debido a su rápida difusión, elevada mortalidad y a que los animales que sobreviven sufren otras infecciones asociadas y se retrasan para salir al mercado (Morilla, 1997; Hulst *et al*, 1996).

La FPC es una infección del cerdo causada por un virus miembro de la Familia *Flaviviridae*, Género *Pestivirus* (Murphy *et al*, 1995; Wirz *et al*, 1993; Thiel *et al*, 1996). Los pestivirus son patógenos importantes en Medicina Veterinaria: los 3 miembros del Género *Pestivirus* son : a) el virus de Fiebre Porcina Clásica (VFPC); b) el virus de Diarrea Viral Bovina (VBVD); c) y el virus de la Enfermedad de la Frontera (BD) de los borregos (Mendoza, 1995; Murphy *et al*, 1995; Horzinek, 1991; Rumenapf *et al*, 1991 y 1998), y éstos últimos por su antigenicidad y por su estructura están cercanamente relacionados con el VFPC (Van Oirschot, 1988). Los pestivirus en general comparten varios hospedadores; los pestivirus de rumiantes han sido encontrados como una infección natural en un gran número de rumiantes domésticos y silvestres (Sandvik, 1997; Moennig, 1992). El VBVD afecta a varios rumiantes y al cerdo (Van Oirschot, 1992). El VFPC se presenta en condiciones naturales sólo en los cerdos domésticos y en los jabalíes; y experimentalmente se puede replicar también en los bovinos, borregos, cabras, conejos, venados y pecaris (Moennig, 1988); después de la inoculación experimental éstos hospedadores heterólogos desarrollaron anticuerpos contra el VFPC, pero no hubo transmisión oral, en condiciones naturales a otros individuos susceptibles de las mismas especies. Experimentos similares indicaron que el VFPC no se replicó en los conejos cola de algodón, palomas, mapaches, ratas, gorriones ni en ratones silvestres (Sandvik, 1997). El VBD en condiciones naturales afecta a los borregos y a los cerdos jóvenes (Wensvoort y Terpstra, 1988; Vannier *et al*, 1988).

1.1 La forma de transmisión más común del VFPC es por contacto directo entre animales infectados y animales susceptibles. La diseminación del virus puede comenzar a partir del segundo día post-infección pudiendo diseminarse virus incluso durante el período de incubación. Las vías de diseminación son fundamentalmente la saliva y secreciones oculares y nasales, y después de unos días también la orina y las heces. Los cerdos que mueren por la infección diseminan virus hasta el momento de su muerte, y en los cerdos que se recuperan se ha demostrado diseminación de virus hasta 30 días después del inicio de la infección (Gómez-Tejedor *et al*, 1994). En la transmisión es importante las diferentes formas de la infección como son :

- 1.1.1 Infección crónica: cuando los animales son infectados con "cepas" de baja virulencia.
- 1.1.2 Infección persistente: debida a casos de tolerancia inmunológica a la infección, sin producción de anticuerpos neutralizantes, y diseminación del virus, sin la presentación de signos clínicos.
- 1.1.3 Infección atípica, que se presenta con signos clínicos y lesiones anatomopatológicas diferentes de las propias de la FPC, confundiendo con otras enfermedades.

En las manifestaciones anteriores, se supone la presencia de un reservorio muy peligroso del VFPC y causante en muchas ocasiones de nuevos brotes sin explicación aparente (Gómez-Tejedor *et al*, 1994).

1.2 Patogemia.- Bajo condiciones naturales el virus penetra al hospedador por la vía oral y nasal (Gómez-Tejedor *et al*, 1994; Terpstra, 1991, Rümenapf *et al*, 1991). Las infecciones naturales por cepas altamente virulentas se caracterizan por una fase linfática, una virémica y una fase visceral. Después de la replicación inicial en las células epiteliales que cubren las criptas de las tonsilas, el virus invade el tejido linforeticular subyacente, de donde es drenado a los nódulos linfáticos regionales. Después de esta replicación inicial el virus invade el tejido linforeticular subyacente, de donde es drenado a los ganglios linfáticos regionales (Terpstra, 1991). Aquí se multiplica y da lugar a una viremia inicial. Se producen grandes cantidades de virus en los tejidos que funcionan como blanco secundario, tales como: nódulos linfáticos viscerales, médula ósea y tracto digestivo (Gómez-Tejedor *et al*, 1994, Terpstra, 1991). Esto da como resultado altos títulos de viremia y la invasión de los órganos parenquimatosos, el tracto respiratorio y el sistema nervioso central (Terpstra, 1991).

La infección de los órganos aparentemente es mediada, vía fagocitosis, por las células reticulo endoteliales y por la multiplicación viral a través del endotelio vascular. La replicación viral en los leucocitos y en el sistema reticulo endotelial acelera la presentación de la leucopenia y predispone al animal a infecciones bacterianas secundarias. Las cepas altamente virulentas se difunden a través del cuerpo dentro de un periodo de 5 a 6 días. Las infecciones producidas por las cepas virales moderadamente virulentas muestran el mismo patrón que el presentado por las cepas altamente virulentas, pero siguen un curso más lento y las concentraciones virales en la sangre y en los órganos tienden a ser más bajas, y están principalmente confinadas a la fase linfática y la fase virémica es breve (Terpstra, 1991).

Los virus virulentos infectan completamente a las células epiteliales y reticulares (Van Oirschot, 1988 y 1992; Terpstra, 1991), y a los macrófagos en las tonsilas; los virus de más baja virulencia se multiplican principalmente en las células epiteliales de las criptas de las tonsilas. Algunas de las cepas atenuadas por pasajes seriados en conejos (cepa China) o en cultivos celulares (cepa GPE y cepa Thiverval), que actualmente son ampliamente usadas como vacunas; parecen replicarse principalmente en las tonsilas y en los nódulos linfáticos (Van Oirschot, 1988).

1.2.1 Signos clínicos.- La enfermedad puede presentar diferentes formas clínicas: la sobreaguda, aguda, subaguda y la crónica; así como una infección transplacentaria que puede dar lugar a diversas afecciones fetales y neonatales, infecciones persistentes, dependiendo del momento de la gestación en que se produjo la infección dando por resultado la presentación de abortos, nacidos muertos o malformaciones fetales (Van Oirschot y Terpstra, 1989, Meyers y Thiel, 1996). De particular importancia es la capacidad que tienen los pestivirus no citopatógenicos (no cp) para establecer infecciones persistentes en los fetos que todavía no son inmunocompetentes; estos animales adquieren una inmunotolerancia hacia el virus, al mismo tiempo que producen una viremia persistente, durante el resto de la vida de los animales afectados (Meyers y Thiel, 1996). Además las distintas cepas y aislados de campo del VFPC condicionan el curso clínico de la

enfermedad de forma importante, porque varían considerablemente en su virulencia y patogenicidad (Van Oirschot y Terpstra, 1989). Algunos autores (Van Oirschot y Terpstra, 1989; Van Oirschot, 1988; Meyers y Thiel, 1996) las clasifican en altamente virulentas, cuando matan prácticamente a todos los cerdos; moderadamente virulentas, cuando dan lugar a una forma subaguda, en lechones infectados después de el nacimiento, pero que también pueden causar anomalías fetales; y las de baja virulencia y cepas avirulentas que son prácticamente apatógenas para los fetos (Sierra *et al*, 1994; Van Oirschot, 1988). La presentación atípica es producida por las llamadas cepas de baja virulencia, éstas son cepas que se han modificado naturalmente en el campo, o son cepas de virus de FPC de origen vacunal; dentro de este último grupo se encuentran diversos cuadros clínicos, más o menos bien definidos: 1) Tremor congénito; 2) FPC agudo en recién nacidos (por contagio materno); 3) FPC agudo en recién nacidos (por contacto con animales vacunados) y 4) FPC postvacunal de baja patogenicidad (Correa y Ramírez, 1986), lo anterior es importante debido a que no es fácil hacer el diagnóstico clínico diferencial (Morilla, 1995).

Las cepas vacunales de virus atenuados, no virulentas, que actualmente se usan son seguras (Meyers y Thiel, 1996). Se ha encontrado que el grado de patogenicidad de los distintos aislados del virus varían con la edad de los animales, y que la edad influye en el curso clínico de la enfermedad, por lo que en consecuencia la FPC puede presentar una gran variedad de formas clínicas y no siempre producir una infección aguda mortal (Sierra *et al*, 1994).

En la forma clínica sobrecuada, la morbilidad y mortalidad son elevadas, muriendo los animales afectados en los primeros 5 días después de la infección; la signología es muy escasa y se reduce prácticamente a un aumento de la temperatura (alrededor de los 41 °C), previo a una muerte rápida a los 2-5 días después de la infección (Sierra *et al*, 1994).

En la forma clínica aguda, la morbilidad es alta y la muerte entre los 10 y 20 días después de la infección, con un curso relativamente lento; los primeros signos aparecen después de un período de incubación de 2 a 6 días y la intensidad de los signos clínicos varía, dependiendo de la virulencia de la cepa y del estado inmune de la población (Sierra *et al*, 1994). Se caracteriza por fiebre, apatía o baja actividad, disminución del apetito y decaimiento, con temperatura a 42 °C o más, y la fiebre persiste hasta poco antes de la muerte de los animales. Los animales que se hacen, manifiestan temblores, conjuntivitis con marcada descarga ocular y en algunos casos descarga nasal; y puede haber afección del tracto digestivo (estreñimiento, diarrea y vómito); en la fase terminal los cerdos adelgazan, tienen una marcha ondulante por debilidad del tercio posterior, seguido por afección del sistema nervioso central, por parálisis del tercio posterior, que luego se generaliza y el cerdo permanece postrado en decúbito lateral y moviendo continuamente las extremidades. Se observa también hiperemia cutánea (en las primeras fases de la enfermedad), sobre todo en orejas, hocico, abdomen y zona medial de las extremidades, con progreso a cianosis; así como hemorragias petequiales en las mismas áreas (Sierra *et al*, 1994; Van Oirschot, 1992).

En la forma clínica subaguda, la muerte se produce entre 20 y 30 días después de la infección; las manifestaciones clínicas son similares a las de la forma aguda, pero con menor severidad, el período de incubación más prolongado y la tasa de mortalidad es menor del 30 % (Sierra *et al*, 1994).

En la forma clínica crónica, es una enfermedad tetai, en la que los cerdos sobreviven más de 30 días después de la infección, su curso es muy lento y puede haber afectación predominante de algún sistema u órgano (pulmón, tracto gastrointestinal, sistema nervioso central o piel) y las infecciones bacterianas secundarias son muy frecuentes, por lo que el cuadro clínico puede ser confuso, se caracteriza por períodos prolongados e intermitentes de fiebre y viremia, puede haber debilidad, retraso del crecimiento, apetito caprichoso y grados variables de tos, diarrea y emaciación (Sierra *et al.*, 1994, Terpstra, 1991). Los diferentes cuadros clínicos pueden ser atribuidos a cepas del VFPC de variada virulencia (Meyers y Thiel, 1996)

El grado de virulencia de FPC aparentemente esta relacionado con algunas características *in-vitro*. Las cepas virulentas crecen óptimamente aproximadamente a 37-40 C, mientras que la temperatura óptima para las cepas de baja virulencia es de los 33 a los 34 C. Las cepas de moderada virulencia se replican óptimamente a temperaturas intermedias, entre los 35 y 38 C. Los virus virulentos usualmente se multiplican mas rápidamente y a mayores títulos en las células PK-15 que las cepas menos virulentas. Además las cepas virulentas son mas resistentes al calentamiento a 56 C, que las cepas de reducida virulencia (Van Oirschot, 1988). La virulencia parece estar relacionada con el grado de elevación de la temperatura y la duración de la viremia, y esto a su vez probablemente depende de lo extenso del crecimiento viral en las tonsilas y en otros órganos linfoides secundarios. Ya que mientras los virus virulentos infectan completamente las células epiteliales, células reticulares y los macrófagos de las tonsilas, los virus de baja virulencia se multiplican principalmente en forma restringida en las células epiteliales de las criptas de las tonsilas (Van Oirschot, 1988). Por lo tanto la virulencia podría ser determinada parcialmente por la interacción del virus y de las células fagocitarias en estos órganos linfoides periféricos.

La observación de que las cepas virulentas de FPC se replican a títulos altos que las cepas menos virulentas en los cultivos de macrófagos alveolares de cerdo, sugiere la probable importancia de la interacciones entre los macrófagos alveolares y el VFPC en cuanto a la determinación del curso y del resultado final de la infección producida por el VFPC (Van Oirschot, 1988).

1.3 Inmunidad . - La respuesta inmune a una infección con el VFPC es altamente variable, dependiendo esencialmente de la cepa de virus, la dosis y la ruta de infección, así como la edad y las condiciones del cerdo (Ehrensperger, 1988). Generalmente la antigenicidad y la inmunogenicidad parecen estar relacionadas con el grado de virulencia del virus en particular: las cepas de alta virulencia usualmente inducen más altos niveles de anticuerpos neutralizantes que las cepas de baja virulencia, y esto posiblemente se debe a la cantidad de virus producido en los animales infectados. La habilidad de los cerdos a responder inmunológicamente al VFPC es dependiente, mayormente, de la antigenicidad del virus, también, como de la madurez inmunológica del huésped; y esta respuesta es demostrada por la detección de anticuerpos neutralizantes, ya que aparentemente éstos son los más importantes en términos de protección (Ehrensperger, 1988).

Ante la infección por el VFPC los cambios observados son una leucopenia, que aparece con la elevación de la temperatura o antes y una trombocitopenia (Sierra *et al.*, 1994). La severa leucopenia que empieza tempranamente después de la infección puede causar una

disminución del número de linfocitos T inmunocompetentes. Por lo tanto, el VFPC se espera que no únicamente dañará la respuesta inmune humoral, sino que también impedirá el que los animales infectados desarrollen una respuesta inmune celular efectiva para combatir ésta infección viral. En consecuencia, la respuesta inmune bloqueada de los animales infectados con virus, conducirá a las manifestaciones de FPC y a un aumento de la susceptibilidad a las infecciones secundarias (Pauly *et al.*, 1998).

La deficiencia de linfocitos B, causada por la destrucción viral de los centros germinales en el tejido linfoide es la consecuencia patoinmunológica más significativa de la infección aguda de FPC. El avance de la enfermedad esta asociada con un aumento significativo en la proporción de los granulocitos y al menos con una casi completa pérdida de linfocitos B, mientras que la reducción de linfocitos T es menos impresionante, en términos absolutos, el número de granulocitos también disminuye. Sin embargo el aumento de los neutrófilos con banda sobre los neutrófilos segmentados indica un indice de aumento de la producción de granulocitos en respuesta a la infección por el VFPC (Milorad *et al.*, 1992), en el estado terminal de la enfermedad, y no se ven afectados en el inicio de la infección (Pauly *et al.*, 1998).

La replicación del VFPC es observada primero en los folículos B y células epiteliales de las tonsilas, y en los folículos B de los nódulos linfáticos regionales, y en las Placas de Peyer, y la diseminación a otros tejidos linfoides, así como la infección de las células endoteliales y de otras células epiteliales ocurre más tarde; esta replicación del VFPC en folículos B es un evento temprano y específico en la FPC y antecede la infección generalizada (Milorad *et al.*, 1992).

La inmunosupresión temprana representa un evento crucial para la manifestación de la FPC (Pauly *et al.*, 1998); hay una destrucción de compartimientos de linfocitos B, en cerdos infectados lo cual puede dañar la respuesta inmune humoral (Pauly *et al.*, 1998). La deficiencia inmune parece no ser debida a la infección de linfocitos T por el VFPC "per-se"; sin embargo, la infección de otras células puede indirectamente conducir a la alteración de funciones de los linfocitos T (Pauly *et al.*, 1998).

1.4 Pestivirus. - El VFPC, pertenece al Género *Pestivirus*; con base en su morfología y a la polaridad de su genoma, en el tipo de ácido nucleico (RNA), los pestivirus anteriormente pertenecían a la Familia *Togaviridae*, pero recientemente y basándose en nuevos conocimientos en lo referente a su estrategia de replicación, organización y expresión del genoma, estructura molecular, secuencia genética, los pestivirus fueron colocados dentro de la Familia *Flaviviridae* y debido a que se reconocieron diferencias fundamentales se estableció esta nueva Familia (Horsinek, 1991; Mcennig, 1992; Murphy *et al.*, 1995; Thiel *et al.*, 1995).

Los pestivirus contienen RNA de cadena positiva (+), de cerca de 12,300 nucleótidos (Elbers *et al.*, 1996), los cuales codifican poliproteínas de aproximadamente 4000 aminoácidos (Elbers *et al.*, 1996 ; Wlirz *et al.*, 1993), y tienen cerca de 12-12.5 kb de largo (Van Oirschot, 1988; Murphy *et al.*, 1995; Fenner *et al.*, 1993; Meyers y Thiel *et al.*, 1996), es pleomórfico, o de partículas tendientes a lo esférico, con diámetro entre 40-60 nm, tienen una envoltura de lípidos de doble capa que rodea al núcleo de 25 a 35 nm de diámetro. El

VFPC tiene proyecciones en la superficie de la envoltura y el núcleo tiene una forma hexagonal (Sandvik, 1997)

De acuerdo con Van Oirschot y Terpstra (1989), los pestivirus son fácilmente inactivados por solventes orgánicos y el uso adecuado de desinfectantes comunes como yodo, aldehídos, hipocloritos y fenol. Son destruidos por ebullición, pero a temperaturas entre 50 y 70 C el efecto del calor en la inactivación ha dependido de la naturaleza del material que contiene al virus, y pueden permanecer infecciosos por semanas a temperatura de refrigeración, son estables a valores de pH entre 5 y 9, y pueden permanecer infecciosos por semanas a temperatura de refrigeración (Sandvik, 1997). El genoma de los pestivirus aparentemente sirve como mRNA y es traducido en una poliproteína de aproximadamente 4,000 aminoácidos, la cual es procesada *co* y *postranslacionalmente* mediante la acción de proteasas codificadas por el virus y por la célula hospedadora (Rümenapf *et al.*, 1991, 1993); el virus consiste de 4 proteínas estructurales: la proteína C de la nucleocápside y las 3 glicoproteínas de la envoltura: E^{ms} (gp48), E1 (gp25) y E2 (gp53) (Elbers *et al.*, 1996; Murphy *et al.*, 1995, Sandvik, 1997). De acuerdo a Murphy *et al.* (1995) y Wirz *et al.* (1993), el orden de los genes es de

5'-p20-p14-gp48-gp25-gp53-p125(p54/p80)-p10-p30-p133(p58/p75)-3', lo cual fue establecido por su reactividad ante anticuerpos específicos de la secuencia. Actualmente 11 proteínas pestivirales han sido identificadas como producto del procesamiento de la poliproteína (Elberts *et al.*, 1996). Las proteínas están en el orden de 5' -NH₂-(N^{PRC}-C-E^{RNS}-E1-E2-p7-NS2,3-NS4A-NS4B-NSSA-NSSB)-COOH-3'. (Un resumen de la distribución de estas proteínas puede observarse en la Figura 1)

Actualmente se tiene la existencia de otra proteína localizada entre E2 y NS2, se trata de la proteína p7 que está presente en el virus de la Hepatitis C. Estudios realizados con el VBVD condujeron a la identificación de una fracción menor de la proteína E2 que tenía una masa molecular aumentada, y mediante antisueros contra la secuencia de aminoácidos de 1065 a 1125, se reconoció específicamente como la proteína E2p7. Además los anticuerpos revelaron a una proteína de 7 kd (p7) en las células infectadas que codificaba al VBVD. Los análisis hechos con el VBVD y con el VFPC sugieren que ni la proteína p7 ni la E2p7 son un componente estructural importante (Elbers *et al.*, 1996). Las proteínas estructurales son codificadas en la parte terminal 5' del ORF (marco de lectura abierta), mientras el RNA-dependiente de la RNA-polimerasa es codificado en la región terminal 3'; poseen 4 proteínas estructurales, 3 de éstas son glicosiladas (Thiel *et al.*, 1992). Los pestivirus crecen a títulos bajos en cultivos celulares, y son en general liberados escasamente de las células y tienden a permanecer dentro de las células infectadas. Los viriones liberados se asocian con componentes procedentes del suero del medio de cultivo, donde la célula es mantenida (Meyers y Thiel, 1996).

1.5 Propiedades físico-químicas del VFPC. - El VFPC es un virus que contiene ácido ribonucleico (RNA) (Van Oirschot, 1992), este virus pertenece a la Familia *Flaviviridae* (Murphy *et al.*, 1995), Género *Pestivirus* (Hursinek, 1991; Murphy *et al.*, 1995), que se caracteriza por producir cuadros clínicos con hemorragias generalizadas (Van Oirschot, 1992). El virus mide de 40-50 nm de diámetro (Van Oirschot, 1992; Zamora *et al.*, 1994)

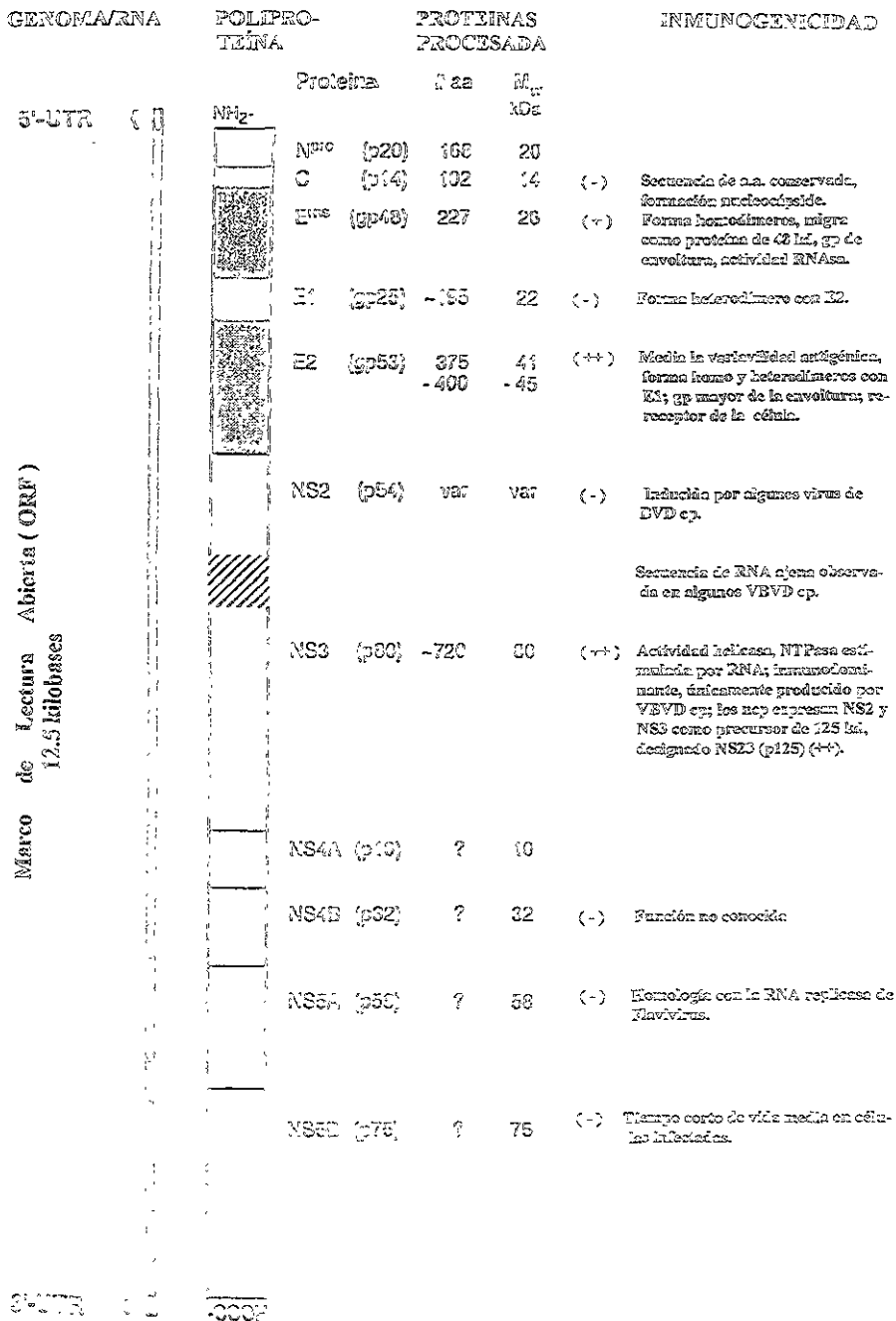


Figura 1.- Mapa esquemático de proteínas codificadas por una "cepa" citopatógena del VBVD (Tomado de Sandvick, 1997).

con una nucleocápside de aproximadamente 29 nm, es envuelto, y la membrana que rodea al núcleo ("core") es hexagonal y tiene proyecciones de 6.3 nm sobre la superficie del virión (Van Oirschot, 1992; Zamora *et al.*, 1994). Los viriones miden de 40 a 60 nm de diámetro y tienen forma esférica, la envoltura del virión tiene en su superficie subunidades en forma de anillos, de 10 a 12 nm. La estructura y simetría del núcleo no ha sido caracterizada (Hulst *et al.*, 1993).

El genoma tiene un solo marco de lectura abierto grande (ORF) que codifica a una poliproteína (Murphy *et al.*, 1995; Moormann *et al.*, 1990; Weiland *et al.*, 1992), el cual se extiende sobre la cadena de RNA viral, de sentido positivo (+) y codifica una secuencia de aminoácidos de 3, 898 residuos, con un PM calculado de 438, 300 (Moorman *et al.*, 1990; Zamora *et al.*, 1994). La densidad boyante, dependiendo del material usado para el gradiente y de las células usadas para propagar el virus, es de 1.12 y 1.17 g/ml, el coeficiente de sedimentación es de $S_{20w} = 140-180$ S (Van Oirschot, 1992; Murphy *et al.*, 1995). El RNA del VFPC sedimenta a 40-45 S en gradiente de sucrosa (10-30 %); y tiene un PM de 4×10^6 D establecido mediante electroforesis en geles de agarosa-poliacrilamida (Moennig, 1988; Rumenapf, 1991; Enzman, 1988; Zamora *et al.*, 1994).

El RNA de cadena sencilla (Van Oirschot, 1992) y polaridad + del virus es infectante (Van Oirschot, 1992; Moennig, 1988, 1992; Zamora *et al.*, 1994 y Enzman, 1988), y tiene cerca de 12-12.5 kb de largo (Van Oirschot, 1992; Rumenapf, 1991; Wirz *et al.*, 1993; Zamora *et al.*, 1994). Los virus de FPC y DVB tienen un alto grado de homología en su secuencia del genoma (Van Oirschot, 1992), la proporción de nucleótidos idénticos entre ambos virus es aproximadamente del 70 % (Wirz *et al.*, 1993); al estudiar el grado de homología entre dos cepas de FPC (Brescia y Alfort), se encontró que fue del 93 %, y al comparar la cepa Brescia de FPC y varias cepas de DVB, se encontró que hubo 70 % de homología; por lo cual se demostró un alto grado de homología entre las secuencias del genoma de ambos virus (Moormann *et al.*, 1993).

La inactivación por tratamientos físicos depende en parte del medio en que este contenido el virus, cuando está suspendido en cultivos celulares, la infectividad se pierde después de 10 minutos a 60 C, y mientras que en sangre desfibrinada es inactivado después de 30 minutos a 68 C. El VFPC es estable a pH 5-10, pero arriba o debajo de este pH, su infectividad es rápidamente destruida (Van Oirschot, 1992); es estable a temperaturas de -20 C y -70 C y liofilizado, donde puede mantenerse por años, y puede durar semanas a temperatura de refrigeración en recipientes de cristal hermético, sin una disminución marcada de la infectividad (Zamora *et al.*, 1994). Los solventes lipídicos como el éter, cloroformo y deoxicolato, inactivan rápidamente al virus (Van Oirschot, 1992). También es sensible a la acción de radiaciones ultravioleta y a pH entre 3-4 y 11-12. La infectividad se destruye fácilmente sometiendo al virus a temperaturas de 60 C durante un mínimo de 10 minutos (Zamora *et al.*, 1994).

1.5.1 Características *in-vitro*. Con el establecimiento de las líneas celulares, hoy en día, el VFPC se puede replicar en una gran variedad de líneas celulares establecidas, de origen porcino, bovino, caprino, primate y cobayo; principalmente es multiplicado en la línea de riñón de cerdo PK-15 o en células de testículo de cerdo (Moennig, 1992; Zamora *et al.*, 1994). A pesar de todo el progreso en las técnicas de cultivos celulares, el rendimiento

de la producción de virus es relativamente bajo, comparado con otros virus de mamíferos (Moennig, 1992; Zamora *et al.*, 1994), y es difícil de trabajar, la producción del virus en cultivos de tejidos es relativamente pobre, las partículas virales son frágiles y asociadas a membranas y difíciles de purificar usando protocolos clásicos (Moennig, 1992). Recientemente, dados los problemas mencionados, se ha usado una línea permanente, derivada de un linfoma porcino (LLP-38A1D), para producir más virus que en los cultivos con células PK-15 convencionales (Moennig, 1992, Zamora *et al.*, 1994), la línea celular de linfoma de porcino es la 38A1D, con la cual se han obtenido rendimientos hasta 10 veces más altos que los obtenidos con las células PK-15 (Zamora *et al.*, 1994).

Para todos los pestivirus, dos biotipos pueden ser distinguidos en cultivos celulares, la forma no citopatógena (no cp), que se replica sin producir daños obvios en la célula hospedadora, y una variante citopatógena (cp) que produce la lisis de las células infectadas. El análisis molecular reveló que los virus cp representan formas mutantes de los no cp. La alteración observada en los genomas de los pestivirus cp, resultan de la recombinación de los que no son homólogos conduciendo a la integración del RNA celular, duplicación o delección del RNA viral (Meyers *et al.*, 1996).

La mayoría de las cepas del VPFC y aislados son del biotipo no citopatógeno (no cp) (Moennig, 1992), por lo que las células infectadas no son lisadas (Moennig, 1992, Meyers y Thiel, 1995, 1996 y Meyers *et al.*, 1996)); con excepción de un número reducido de cepas citopatógenas (cp) (Meyers y Thiel, 1995, 1996; Meyers y Thiel, 1996), hasta recientemente se tienen conocimientos acerca de las propiedades moleculares de las cepas cp de VPFC (Moennig, 1992; Meyers y Thiel, 1996). Sin embargo, la coexistencia de un virus no cp y un cp ha sido demostrada en un bovino que murió de BVD, y el análisis molecular reveló que al ser comparado con el virus de BVD no cp, el genoma de los aislados cp muestra arreglos debidos a eventos de recombinación, en los cuales se observó la integración de secuencias de la célula huésped con o sin duplicación de las secuencias del virus, duplicación compleja y arreglos de las secuencias virales, y delecciones internas de partes considerables del genoma (Meyers y Thiel, 1995; Sandvik, 1997), que dan por resultado genomas de tamaño entre 8 y 16.2 kb (Sandvik, 1997).

En el caso del VPFC la mayoría de los aislados no producen citopatógenidad en los cultivos celulares inoculados, muchas publicaciones afirman que el VPFC es generalmente considerado como no cp, por otra parte hay algunas publicaciones anteriores acerca de la identificación de cepas cp del VPFC (Meyers y Thiel, 1995); sin embargo, recientemente se detectaron 3 cepas cp del VPFC y al estudiarlas se encontraron que contenían virus defectivos además del VPFC estándar. Las variantes defectivas mostraron partículas de delección interna tipo DI características. Interesantemente el aislamiento de placas y los experimentos de transfección de RNA mostraron que las partículas de delección interna (DI) del VPFC representan los agentes citopatógenos de estos aislados del VPFC cp, lo cual resulta de una recombinación. Las partículas DI se caracterizan por dos propiedades típicas. Por una parte, dependen del virus ayudador, para complementar sus defectos genómicos, por otra parte, la replicación de las partículas DI interfiere con la replicación del virus ayudador, por consiguiente la proporción entre partículas DI y virus ayudador varía en el curso de la infección y es muy influenciada por la multiplicidad de infección (m.o.i.) usada para la inoculación inicial (Meyers y Thiel, 1995 y 1996).

La caracterización molecular de 3 aislados independientes de FPC (cepas Alfort/M, ATCC, y Steiermark) han dado resultados interesantes. Ya que en los 3 aislados independientes de FPC dos RNAs específicos del virus fueron identificados dentro de las células infectadas. Uno de estos RNAs tenía el tamaño del RNA genómico del VFPC (12.3 kb), mientras que el otro era de solamente 7.5 kb. Mediante enfoques análogos a los utilizados para la caracterización del VBVD, se demostró que los aislados de FPC cp también están compuestos de DIs cp y virus ayudadores no cp (Meyers y Thiel, 1995 y 1996). La cepa Alfort/M cp fue generada durante pases en cultivos celulares a partir de la cepa Alfort-FPC no cp; y por otra parte la ATCC y la Steiermark más probablemente fueron obtenidas directamente de animales infectados, por lo tanto los pestivirus cp probablemente pueden surgir por recombinación en cerdos infectados. En el caso de BVD cp un resultado obvio de los cambios inducidos por la recombinación es la expresión de NS3, lo cual no es observado en las células infectadas con BVD no cp. En contraste BVD y FPC pueden expresar NS3 además de NS2-3; ya sea que estos virus sean o no cp. Por lo tanto, por lo menos en el caso de BD y de FPC, la mera presencia de NS3 dentro de una célula infectada, parece no ser suficiente para la inducción de la citopatogenicidad. Sin embargo, incluso aún cuando falta información cuantitativa confiable, el análisis de proteínas indica que la cantidad de NS3 es dramáticamente más alta en células infectadas con FPC cp o con BD cp que en aquellas células en las que se está replicando FPC no cp o BD no cp. Es posible que una determinada concentración de NS3 sea requerida para la inducción de efecto citopático (ECP), el cual no es alcanzado después de la infección con BD no cp o con FPC no cp. Alternativamente, la NS3 expresada por los virus no cp podría ser estructuralmente diferente de la NS3 de los aislados cp. Una terminal amino particular de la NS3 es crítica para determinar la citopatogenicidad (Meyers y Thiel, 1996; Meyers *et al.*, 1996).

Se ha encontrado que la recombinación del RNA, puede ocurrir durante la síntesis de la cadena (-), así como de la cadena (+) del genoma, pero en varios casos predomina la recombinación durante la síntesis de la banda (-); ésta última síntesis se debe a que hay concentraciones mucho mayores de cadenas (+), las cuales representan los tempietes aceptores (Meyers y Thiel, 1996; Meyers *et al.*, 1996).

Todos los pestivirus recombinantes analizados hasta ahora muestran un fenotipo cp. La citopatogenicidad de éstos virus en todos los casos se correlaciona con la expresión de esta proteína NS3, o por lo menos con una producción aumentada de esta proteína. La habilidad para expresar la NS3 está ligada a los cambios inducidos por la recombinación a nivel del genoma. El fenotipo citopatogénico de los pestivirus usualmente correlaciona con rearrregios del genoma que resultan de la recombinación, para el VFPC la correlación entre los rearrregios del genoma y la citopatogenicidad fue recientemente demostrada por generación de DI cp a partir de secuencias clonadas, vale la pena hacer notar que todos los diferentes cambios identificados a nivel del genoma directamente influyen al gene NS2-3. Como resultado de estos rearrregios la expresión del NS3 puede ser observada en el sistema del VBVD. Para el VFPC y VBD, el efecto de los cambios genómicos es más difícil de ser interpretado. Sin embargo, es muy claro, que en estos casos, también la expresión del NS3 cambia dramáticamente. El hecho de una variedad de mutaciones diferentes se correlaciona con dos cambios fenotípicos (ósea la alteración específica en el patrón de polipéptidos virales y la citopatogenicidad de los virus respectivos) es un fuerte

argumento para una conexión casual entre la recombinación, la expresión de NS3, y la citopatogenicidad. Parece probable que NS3 es responsable del ECP de varios pestivirus cp (Meyers y Thiel, 1996; Meyers *et al*, 1996).

1.5.2 Replicación viral . - La organización del genoma y estrategia de replicación es similar para todos los pestivirus (Sandvik, 1997). Se considera que los pestivirus se replican en el citoplasma de la célula hospedadora, y para estos virus nunca se ha reportado ni la transcripción reversa, ni la detección del antígeno viral o del ácido nucleico en el núcleo. Por lo tanto la integración de las secuencias celulares o el rearrreglo de las secuencias virales, responsable de la generación de los genomas de los pestivirus debería ocurrir a nivel del RNA en el citoplasma de las células infectadas (Meyers y Thiel, 1996). La replicación de los pestivirus ocurre en asociación con la membrana intracitoplásmica. En las células infectadas no se han encontrado mRNAs no subgenómicos; el RNA genómico es traducido a una poliproteína que es rápidamente procesada co-translacional y post-translacionalmente. La iniciación de la traslación puede ocurrir vía la entrada del ribosoma en un sitio interno dentro los 385 nucleótidos de la región no codificante 5' del RNA. La síntesis del RNA de la célula hospedadora y la síntesis de las proteínas, continua a través de la infección (Murphy *et al*, 1995). Los viriones de los pestivirus parecen madurar en la membrana intracitoplásmica, posiblemente pertenecientes a el retículo endoplásmico (RE), y la liberación del virus es más probablemente llevado a cabo vía exocitosis de vesículas de la membrana conteniendo el virus (Thiel *et al*, 1996) La cinética de la replicación de los pestivirus depende fuertemente de la cepa de virus y de la cepa de células usadas. La adsorción del virus a la superficie celular es lenta. El virus sintetizado es encontrado entre las 4 y 7 horas postinoculación, con un crecimiento exponencial hasta las 15 horas postinoculación. De ahí en adelante, los títulos todavía tienden a aumentar hasta las 50 horas postinoculación, resultando en valores máximos de 500 a 1000 UFP/célula (Enzmann, 1988).

La replicación del VFPC tiene lugar en el citoplasma celular, siendo posteriormente liberado al medio extracelular, adquiriendo una envoltura lipídica muy lábil, que contiene componentes de la célula hospedadora (Zamora *et al*, 1994). La observación al microscopio electrónico de cortes ultradelgados de células infectadas con VFPC sugieren que las partículas virales se ensamblan y maduran dentro de vesículas intracitoplasmáticas ligadas a la membrana (Terpstra, 1991).

1.6 Características moleculares del VFPC.- A pesar de los estudios realizados, sobre la composición molecular del virus, ésta no está totalmente definida, existiendo divergencias en el número y en el PM de la proteínas caracterizadas por diferentes grupos de investigadores (Zamora *et al*, 94). Anteriormente poco se conocía de las proteínas estructurales y no estructurales del VFPC; inicialmente fueron reconocidas 3 proteínas estructurales: de las cuales 2 gp correspondieron a la envoltura con un radio molecular (M_r) de 55, 000 (55 k) y de 46, 000 (46 k); y una proteína del núcleo, no glicosilada, con un M_r de 36, 000 (36 k) (Wensvoort *et al*, 1990; Van Oirschot, 1992). Estas 3 proteínas estructurales de los pestivirus, fueron tentativamente llamadas E1 (55 a 57 kD), E2 44 a 46 kD) y C (34 a 36 kD) (Wensvoort *et al*, 1990).

Mediante experimentos con viriones del VFPC, multiplicados en células PK-15 y purificados en gradiente marcados con metionina (^{35}S), se demostraron 3 especies principales de proteínas específicas del virus con PM de 54-56 kd, 45-47 kd y 35-37 kd, y mediante el marcaje con sodio (^3H) del VFPC concentrado y purificado, se demostró que los dos polipéptidos más largos son glicoproteínas localizadas en la superficie. El origen viral de estos polipéptidos se demostró por radioinmunoprecipitación. Y estos polipéptidos fueron llamados E1 (gp55), E2(gp46) y C(p36). La proteína E2 es la predominante del virión en los sobrenadantes de los cultivos celulares (Enzmann, 1988). En el caso del VBVD en forma similar al VFPC, los péptidos con PM arriba de 75 kd fueron considerados como precursores no divididos, dado que ellos no están presentes regularmente (Enzmann, 1988). En los estudios realizados por Enzmann (1988), se analizaron por radioinmunoprecipitación los polipéptidos del VFPC y VBVD. En contraste con reportes anteriores en los cuales los anticuerpos contra FPC no reaccionaron con la p34 de BVD, todos los polipéptidos de FPC y BVD fueron precipitados por los anticuerpos contra FPC y por los anticuerpos contra BVD, pero con diferente grado de reacción. Esta proteína (E2) fue la mejor precipitada por los sueros heterólogos.

La reactividad de los péptidos de alto PM, del VFPC, con los anticuerpos, depende del origen del suero inmune. Los sueros de cerdos convalecientes usualmente precipitaron los péptidos de alto PM en un grado mayor que cuando se produjeron sueros hiperinmunes por inoculación de virus purificado mediante el cual los péptidos de bajo PM fueron detectados. Como sucedió en el modelo en el que se usaba VBVD, un suero contra FPC producido en cerdos mediante inyecciones repetidas de viriones purificados mostró una buena reactividad con una cepa altamente patógena de FPC y dio solo una reacción pobre con una cepa de baja patogenicidad. Aquí nuevamente la reactividad del virus con anticuerpos de diferentes procedencias, parece depender de la presencia o ausencia de péptidos (en el virión) de alto o de bajo PM. La capacidad de los precursores para ser divididos en la célula infectada determina si el antígeno es bien reconocido o pobremente reconocido por los anticuerpos (Enzmann, 1988).

El antígeno soluble del VBVD aparece temprano en los cultivos infectados y es liberado junto con el virus infeccioso. En el Género *Pestivirus* parece ser un evento normal, dependiendo de la "cepa" de virus usada el que los precursores no divididos de las proteínas estructurales sean incorporados dentro del virión. Mediante esta hipótesis sería posible explicar el efecto protector del antígeno soluble (Enzmann, 1988).

Rümenapf *et al* (1993) menciona que las proteínas estructurales están localizadas dentro del tercio correspondiente a la terminal N de la poliproteína; e informaron sobre la composición de las proteínas del VFPC. Los viriones purificados consisten de la p14, que se cree es la proteína (C) de la nucleocápside, y 3 glicoproteínas asociadas a la envoltura (proteínas E). La E0 (gp44/48), la E1 (gp33) y la E2 (gp55), en el orden de su arreglo dentro de la poliproteína. La proteína de la cápside pestiviral es precedida en la poliproteína por la proteína no estructural p23 la cual es una supuesta proteasa con actividad autoproteolítica y la cual no tiene contraparte con los flavivirus. Los anticuerpos que neutralizan la infectividad viral están dirigidos en contra de los epítomos localizados en la E2 y en la E0. E1 se cree que esta enterrada en la envoltura viral y casi no se han descrito anticuerpos contra esta proteína. Las glicoproteínas forman complejos de bandas disulfuro,

un homodímero E0 con un tamaño de 100 kD, un heterodímero E1-E2 con un tamaño de 75 kD y un homodímero E2 con un tamaño de 100 kD, todos los cuales son encontrados tanto en las células infectadas como en los viriones (Rümanapf *et al*, 1993).

El genoma de los pestivirus contiene RNA, codifica a una poliproteína grande, que se divide en varias proteínas, las proteínas estructurales están en la terminal N de esta poliproteína (E0, E1 y E2); se ha demostrado que la proteína E012 es la precursora de las 3 glicoproteínas antes mencionadas, las cuales son procesadas en el orden mencionado. Durante el procesamiento primero se separa la E2 de la E01, y después de que la E2 es liberada del precursor, la E01 es dividida en la E0 y en la E1. El punto de corte para la E0 (gp44/48) en la terminal N fue Glu-268; para la E1 (gp33) fue la Leu-495, y para la E2 (gp55) la Arg-690. La proteína E0 sale de las células infectadas y puede ser detectada en el medio de cultivo sobrenadante libre de virus. Hay 3 sitios de corte en la formación de las glicoproteínas, es decir entre la cápside y la E0, entre la E1 y la E2 y el punto de corte en la terminal C de la proteína E2; estos puntos de corte son probablemente mediados por la señalasa de la célula hospedadora. El esquema propuesto por Rümanapf *et al* (1993) (Figura 2), para el procesamiento de las proteínas E de los pestivirus es el siguiente: el procesamiento es iniciado por la translocación de la señal del péptido "corriente arriba" (o sea en dirección opuesta a como ocurre el procesamiento), las señalasas tienen su punto de corte entre la cápside y la proteína precursora naciente E012, ocurre rápidamente durante la translocación y es efectuada por una señalasa. Las proteínas E0 y E1 son cortadas por una proteasa desconocida, la proteína E1 lleva dos regiones, la primera de las cuales actúa como una señal de alto-transferir para la E1 y la segunda de las cuales funciona como una señal de translocación para la proteína E2. En la terminal C de la proteína E2 aparentemente esta la señal de alto-transferir para la E2 y la señal de translocación "corriente abajo" para la proteína; el producto de translocación "corriente abajo" después de la E2 es hipotético y no ha sido identificado. El siguiente producto de la translocación es la proteína no estructural p125. Es interesante hacer notar que después ocurre la formación de un heterodímero estable E1-E2, y por lo tanto después de que las proteínas E han dejado el Retículo Endoplásmico (RE); esto podría indicar que las proteínas E1 y E2 se asocian solamente después, posiblemente durante el ensamble del virus.

Las glicoproteínas presentes en el virión son exclusivamente hetero u homodiméricas; por lo tanto la dimerización podría ser importante en el ensamble del virus. Las proteínas E1 y E2 están casi por seguro ancladas en la bicapa de lípidos de la envoltura, y el mecanismo mediante el cual la E0 se asocia con el virión todavía no está claro. El hecho de que cantidades considerables de la E0 estén presentes en el medio de cultivo indican que la asociación de la E0 con la envoltura es más tenue que la asociación de la E1 y la E2 con la envoltura (Rümanapf *et al*, 1993).

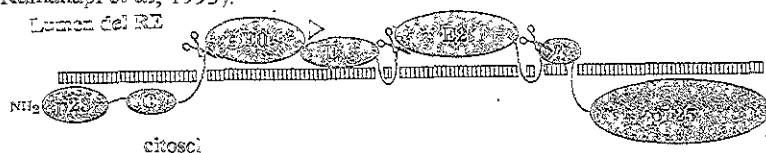


Figura 2.- Esquema propuesto del procesamiento de las proteínas E de los pestivirus (Tomado de Rümanapf *et al*, 1993)

Hulst *et al* (1993), menciona que el RNA del VFPC, está rodeado por una envoltura conteniendo 3 glicoproteínas, denominadas de acuerdo con su nomenclatura: E1 (gp51 a gp54), E2 (gp44 a gp48), y E3 (gp31); dichos autores mencionan que de estas glicoproteínas, la que ellos denominan glicoproteína E1 estimula una fuerte respuesta de anticuerpos en los cerdos vacunados. Sin embargo, los animales infectados con Pestivirus (y/o VFPC) desarrollan anticuerpos contra al menos 2 glicoproteínas virales, la E1 y E2, pero la E1 es la más inmunodominante, está presente en la envoltura, y juega un importante papel en la neutralización del virus (Hulst, 1996).

Greiser-Wilke *et al* (1990), para probar que algunos antígenos de FPC son altamente conservados, usó cepas de FPC, aislados de FPC, y 8 AcM's dirigidos contra la cepa Alfort/187, y mediante el uso de pruebas de radioinmunoprecipitación en combinación con la actividad neutralizante de los AcM's, demostraron que los AcM's fueron dirigidos contra un doblete de 56-60 kD procedente de células infectadas con el VFPC y lisadas, que representa a la glicoproteína mayor de la envoltura del VFPC; y al usar un suero policlonal, éste específicamente precipitó proteínas con PM's de 120, 80, 53 y 37 kD, pero en este caso no se detectó el doblete de 56-60 kD.

Con base en el uso de AcM's se definieron las relaciones espaciales de los epítomos para FPC, éstos fueron agrupados en 4 dominios antigénicos (A, B, C y D). Estos AcM's reconocieron una proteína de la envoltura E1, que varió en tamaño de 51 a 56 kD (en 3 "cepas" probadas), con determinantes antigénicos grandes y conservados e involucrados en la neutralización y en las células infectadas siempre estuvo conectada o asociada con una gp de 31 kD (Wensvoort *et al*, 1990). Con la cepa Brescia del VFPC en células infectadas y bajo condiciones reductoras en electroforesis (PAGE), 3 gp específicas fueron detectadas: 54 kD, 51 kD y 31 kD. Las gp 54 y 51, están asociadas con el virus infeccioso, y la gp 31 no (Wensvoort *et al*, 1990); el doblete gp54 y gp51 es la proteína de envoltura E1; esta gp 31 es específica para el VFPC, pero no es muy antigénica, por lo que puede ser no estructural, o similar a la proteína pre-M de los Flavivirus (Wensvoort *et al*, 1990), y puede ser encontrada solo en viriones maduros. Weiland *et al*, (1990), identificaron proteínas estructurales del VFPC, codificadas en la región 5' terminal de el genoma viral, en las que se incluyen una proteína del núcleo en la terminal NH₂ de la poliproteína seguida por 3 gp con PM de 44,000 a 48,000; 25,000 a 33,000; y 53,000 a 58,000 d; detectó además bandas difusas de 80 a 100 kD, para VFPC. Las gp codificadas por el virus, presentes sobre la superficie externa de viriones y/o células infectadas, son importantes en el curso de la infección y son importantes en la respuesta inmune del hospedador.

Thiel *et al* (1991), localizan proteínas de la envoltura del virus, las cuales fueron 3 gp (gp44/48, gp33 y gp55) que existen en forma de dímeros, en células infectadas y en viriones. La primera proteína codificada dentro del ORF de los pestivirus es una molécula de 20 a 23 kD, la cual se ha asumido que representa la proteína de la nucleocápside viral (Thiel *et al*, 1991), y luego un componente estructural de la nucleocápside, la p14 ó 14 kD que está localizada entre la p20 y la p23 y que es la primera gp viral (Thiel *et al*, 1991). Entre la p23 y la p14 hay una actividad autoproteolítica, la cual ocurre en p23, esta actividad proteolítica es la responsable de la división entre p23 y p14; o sea que la p14 es procesada dentro de la poliproteína por la proteína no estructural p23 (Roehne *et al*, 1991, Stark *et al*, 1993). Después se tiene translocación de la gp44/48 y de 2 gp adicionales, la

gp33 y la gp55, que están presentes en las células infectadas y en los viriones (Thiel *et al.*, 1991; Thiel *et al.*, 1992). Las 3 gp forman parte de dímeros ligados a bandas disulfuro, las cuales están presentes en las células infectadas, y aparentemente son parte de la envoltura del virus, la gp55 está en la superficie del virión e interviene en la neutralización (Thiel *et al.*, 1992). Posteriormente una proteína de PM de 53 kd es detectada en el VFPC y parte de esta proteína es codificada por un fragmento del genoma de 634 bp, es una proteína estructural mayor o principal de la envoltura, involucrada en la neutralización (Roche *et al.*, 1991). Rumanapf *et al.* (1991), menciona que la gp55, representa un antígeno que induce anticuerpos virusneutralizantes. El gene de la proteína E1 fue seleccionado para ser insertado dentro del genoma del virus atenuado de Pseudorrabia (VPRV) (como vector), para que expresara la proteína E1 del VFPC, con la cual fueron vacunados cerdos, los cuales desarrollaron altos títulos de anticuerpos contra PRV y FPC, y de esta forma los cerdos fueron protegidos contra PRV y FPC (Maddy *et al.*, 1991).

En los últimos años la obtención de AcM's contra el VFPC han aportado datos más precisos sobre las distintas proteínas que componen al virus, y se ha podido comprobar que la gp55 posee 4 dominios antígenicos, 3 de ellos son dominios transmembrana, inducen anticuerpos neutralizantes y son inmunológicos, y uno de éstos 3 dominios es muy conservado en todos los aislados estudiados (Zamora *et al.*, 1994).

Utilizando un panel de 15 AcM's contra el VFPC se identificaron diferentes proteínas virales con PM relativo de 40, 46, 120 kd y una proteína compleja, que contiene polipéptidos de 15, 16, 27 y 55 kd; la proteína de 40 kd fue detectada a partir de viriones, la de 46 kd a partir de lisados celulares y no estuvo presente en viriones y las proteínas glicosiladas de 15, 16 y 55 kd forman un heterodímero con un PM relativo de 65 kd (Muyldermans *et al.*, 1993). Usando AcM otro autor también, reconoció diferentes polipéptidos de origen viral: p40, gp46, gp15/16- p27- gp55 y p120, y una proteína de PM de 39 kd, en células lisadas. Y bajo condiciones no reductoras, los AcM precipitaron proteínas de 46 kd y 65 kd, esta última migró en forma de dos distintas proteínas de 55 y 15/16 kd, la de 46 kd en una de 27 kd (p27) y una de 15/16 (Muyldermans *et al.*, 1993). A partir de células infectadas, Rumanapf *et al.* (1991), precipitaron 3 gp (la gp33, gp44/48 y la gp55), las cuales son componentes estructurales del virión. Las 3 gp fueron codificadas dentro de los nucleótidos 1100 a 3600 (NH₂ - gp44/48 / gp33 / gp55 - COOH), y bajo condiciones no reductoras, moléculas de PM de 55 kd, 68 kd y 90-100 kd; la de 68 kd representa un heterodímero entre gp55 y gp33 (Rumanapf *et al.*, 1991).

Los trabajos realizados han puesto de manifiesto que el virión está compuesto de 4 proteínas estructurales, 3 de ellas son glicosiladas (la gp55, gp44/48 y gp 33), y forman parte de la envoltura viral; la cuarta es una proteína identificada recientemente de 14,000 d (p14), que se asume que es una proteína de la nucleocápside. Se han descrito varias proteínas no estructurales del virus, entre las cuales se incluyen la p120, p75 y p23, esta última considerada hasta hace poco como una proteína estructural que forma la nucleocápside del virus (Zamora *et al.*, 1994). De las proteínas estructurales, la gp55 y más recientemente la gp44/48 están implicadas en la inducción de anticuerpos neutralizantes, la gp33 representa posiblemente una proteína de transmembrana y con menor inmunogenicidad que la gp55. La gp 55 y la gp44/48 forman dímeros unidos por enlaces disulfuro, confiriendo a la envoltura una composición muy particular no observada hasta el momento en otros virus RNA, distintos a Pestivirus. La gp55 forma heterodímeros unidos a

puentes disulfuro con gp33. Estas estructuras homo y heterodiméricas, podrían ser de gran relevancia en el ciclo vital del virus, y en la inducción de los mecanismos inmunológicos de protección, basados en la inmunorespuesta frente a las proteínas estructurales, aunque el significado biológico de estas formas diméricas no se conoce (Zamora *et al.*, 1994). Con los análisis de radioinmunoprecipitación y de "western-blot" utilizando anticuerpos específicos y péptidos sintéticos determinados a partir de la secuencia de nucleótidos, se ha realizado el mapeo del genoma, correspondiente a los genes que codifican para las distintas glicoproteínas. La secuencia de estos genes, en el genoma viral, queda en el siguiente orden: 5'-gp44/48 - gp33 - gp55 - 3', codificadas por los nucleótidos comprendidos entre 1,100 y 3,600. (Zamora *et al.*, 1994). La región genómica entre los nucleótidos 364 a 1,100 probablemente codifica para la proteína de la nucleocápside, la p23 que no es estructural, codificada al inicio del ORF, que no forma parte del virión; y en lugar de ésta, la proteína de la nucleocápside es otra proteína con un PM de 14 kd, cuyo gen está entre los genes que codifican la p23 y la primera gp (gp44/48) (Zamora *et al.*, 1994); y el procesamiento entre p23 y p14 se realiza en fases tempranas, por una actividad autoproteolítica que parece residir en la p23 (Zamora *et al.*, 1994; Robert Stark *et al.*, 1993).

Recientemente, usando el virus de vaccinia recombinante (VVR), las gp E0 y E2 de FPC se detectaron sobre la superficie de células infectadas con VVR; y se demostró que los cerdos vacunados con el VVR que expresaba E0 y/o E2 resistieron un desafío letal contra la FPC, y se determinó que la E0 es un segundo determinante para la inducción de inmunidad protectora contra la FPC (Koning *et al.*, 1995); pero ambas proteínas (E0 y E2) inducen anticuerpos neutralizantes. Se han descrito 3 formas diferentes para la gp E2: E2 monómero (55 kd); E2 homodímero (100 kd), y E1-E2 heterodímeros (75 kd), las formas diméricas son encontradas en las células infectadas y en los viriones (Koning *et al.*, 1995); sin embargo la expresión de E2 sola excluye la formación de heterodímeros E1-E2, que están presentes en grandes cantidades en las células infectadas y en los viriones. Esta dimerización de proteínas virales puede ser importante para la auténtica presentación de los antígenos ante el sistema inmune del huésped y para la inducción de una inmunidad estable y duradera (Koning *et al.*, 1995). Meyers *et al.* (1996), describen también, que la E0 y la E2 están localizadas en la superficie de los viriones.

Windisch *et al.* (1996), menciona que en la parte 5' terminal del RNA del VFPC se codifican las proteínas estructurales, la proteína de la cápside C y 3 gp de la envoltura (E0, E1 y E2), donde E0 y E2 inducen la formación de anticuerpos neutralizantes e inducen inmunidad protectora en el hospedador natural. E0 forma un heterodímero con PM de 97 kd, y es secretada a partir de las células infectadas, tiene actividad intrínseca de RNAsa, y juega un papel en el ciclo de vida viral.

Al realizar un estudio con la cepa Aiford de FPC y con 8 cepas más de FPC procedentes de lisados de células infectadas, se detectaron 3 proteínas con un PM relativo de 76, 107 y 145 kd en la región 3' terminal del VFPC, que codifica las proteínas no estructurales (Kassimí *et al.*, 1996). En base a la localización de los genes de las gp, se ha sugerido que las proteínas estructurales virales son codificadas en la región 5' terminal del genoma, y las proteínas no estructurales en la región 3' terminal. La primera proteína del ORF es la p23, que es una supuesta proteasa con actividad autoproteolítica, no asociada al virión. Después, corriente abajo, de esta proteína (p14), que es la proteína de la cápside viral, y las tres gp de

la envoltura viral (VFPC gp44/48, gp33 y gp55). La parte restante del CRF representa la región codificante de las proteínas no estructurales, y la primera proteína de esta región es la p120, la cual en células infectadas con cepas citopatógenicas es dividida para dar 2 proteínas, p54 y p80, para el caso del VBVD, y sólo la proteína p120 es producida en células infectadas con cepas no cp. Se identificaron 3 proteínas no estructurales en la región terminal 3' del genoma del VFPC, con PM's relativos de 76, 107 y 145 kd, en la cepa Alfort y en otras 8 cepas de FPC, las proteínas de 107 y 145 kd pueden representar precursores de la proteína de 76 kd, la p145 puede ser una proteína precursora, que al ser dividida da la p38 y la p107; y la división posterior de la 107, puede dar como resultado a la p31 y a p76. Los precursores 107 y 145 kd del VFPC, son más estables y pueden acumularse en células infectadas. De acuerdo a éste autor, no se observan diferencias entre las 9 cepas de FPC examinadas por ellos (Kassimi *et al*, 1996).

De acuerdo a Eibers *et al* (1996) una nueva proteína que es parte integral del virión de la FPC, es la p7; y además 2 formas de la E2 pueden ser detectadas en las células infectadas (E2p7 y E2). La proximidad entre la E2 y la p7 en la poliproteína y la formación de la proteína de fusión E2p7 sugieren que participa en la maduración de la glicoproteína y/o en la morfogénesis del virus (Eibers *et al*, 1996).

Bruschke *et al* (1997), mencionan que la proteína E^{ms} de la envoltura del VFPC, es identificada como una RNAsa, o tiene una actividad de RNAsa; las RNAsas pueden expresar diferentes funciones biológicas, y una de éstas es su propiedad inmunosupresiva *in-vitro*; ya que la (E^{ms}) fue capaz de inhibir fuertemente la síntesis de proteínas en los linfocitos de diferentes especies, sin causar daño en la membrana celular, y apoptosis en los linfocitos; por lo que E^{ms} juega un importante papel en la patogénesis de los Pestivirus, ya que esto último se manifiesta en forma de leucopenia e inmunosupresión. Y Hulst *et al* (1998) también describen que la gp E^{ms} que tiene la actividad de RNAsa, está involucrada en la infección del virus, y esta actividad juega un importante papel en la replicación del Pestivirus y se especula que quizá sea responsable de la persistencia del virus en su hospedador natural; los VFPC RNAsa negativos inducen efecto citopático en células de riñón de cerdo (Hulst *et al*, 1998).

1.7 Relaciones antigénicas entre los Pestivirus.- Los trabajos iniciales de investigación realizados con sueros policlonales, demostraron que había relaciones antigénicas entre los virus de FPC y DVB; esto también fue demostrado mediante las pruebas de seroneutralización cruzada, y con la utilización de anticuerpos monoclonales (AcM). Estas pruebas también han sido empleadas para investigar las relaciones antigénicas entre las 3 especies de Pestivirus (FPC, DVB y BD); para diferenciar entre las diferentes cepas de virus y para caracterizar las proteínas individuales (Thié *et al*, 1996). Entre los distintos Pestivirus hay una gran semejanza en las propiedades físico-químicas, en cuanto a su densidad en gradientes y coeficientes de sedimentación; así mismo, hay equivalencia entre las distintas proteínas estructurales, de modo que las proteínas gp55, gp44/48, gp33, p23 y p14 del VFPC, son semejantes a las proteínas gp53, gp48, gp25, p20 y p14 del VDVB, se ha observado una alta homología, tanto a nivel de nucleótidos como de aminoácidos; en los nucleótidos la homología es de 66-74 %, y es hasta de un 85 % con respecto a la homología de los aminoácidos (Zamora *et al*, 1994).

Los Pestivirus puede ser neutralizados por anticuerpos dirigidos contra una de las 2 gp (E0, E2) (Thiel *et al*, 1996); pero la E2 parece ser la proteína contra la que más reaccionan los anticuerpos virus neutralizantes, esta gp es altamente variable en su porción N-terminal, y la comparación de las identidades de aminoácidos dentro de la gp E2, es particularmente útil para demostrar variaciones entre Pestivirus (Thiel *et al*, 1996). Este análisis de nucleótidos y de las secuencias de aminoácidos ha servido para determinar: i) la similitud entre las cepas del VDVB y de los VFPC; ii) la homología de determinadas regiones; y iii) las relaciones entre las proteínas individuales.

La taxonomía que clasifica los pestivirus de acuerdo al hospedador y a la enfermedad, es engañosa, por lo que se ha sugerido que la homología de las secuencias de nucleótidos sea usada para la diferenciación de los pestivirus y que sean divididos dentro de 4 tipos: pestivirus 1 (cepas clásicas de VDVB), pestivirus 2 (cepas del VFPC), pestivirus tipo 3 (cepas verdaderas del VBD), y pestivirus tipo 4 (nuevos grupos de aislados de bovinos y ovinos) (Meyers *et al*, 1996; Roizman y Paese, 1996; Sandvik, 1997).

Con respecto al VFPC, una marcada variación antigénica está presente entre las cepas del VFPC, y basándose en la reacción ante AcM (marcados) preparados contra el VFPC, varios grupos antigénicos pueden ser distinguidos. Aún dentro de algunas cepas de FPC, la heterogeneidad antigénica esta presente; y no se encuentra una relación entre los grupos antigénicos y la virulencia (Van Girschof, 1992). De acuerdo con Mendoza (1995), con AcM dirigidos hacia las gp E1 y E2 se han detectado 13 determinantes antigénicos integrados en 4 grupos: A, B, C y D. En los grupos B y C, se encuentran los AcM que se dirigen hacia los sitios neutralizantes (Mendoza, 1995). En el grupo A (subgrupo A2), están los AcM que se dirigen hacia los sitios conservados (Mendoza, 1995); mientras que en el subgrupo A2, se encuentran los AcM's contra ambos sitios; el grupo D, no muestra ninguna actividad (Mendoza, 1995). Los AcM del grupo A, números 2, 3, 4 y 7 reconocen los sitios neutralizantes y los conservados de la gp E1. Los AcM 9, 10 y 11, reconocen sitios conservados de la gp E1, subclasificados como A2. El AcM 6, del grupo B, reconoce sitios neutralizantes de la gp (Mendoza, 1995).

Se ha obtenido un panel de AcM's de referencia, para ser empleado en el diagnóstico diferencial, los cuales muestran diferentes patrones de reactividad con los distintos virus analizados (Zamora *et al*, 1994); y se han clasificado en 4 grupos según reconocieran a:

Grupo 1 . - Que corresponde a los AcM's específicos de todos los Pestivirus, y que reconocieron a una proteína no estructural de 80-125 kD, este antígeno se expresa en estadios tempranos de la infección (Zamora *et al*, 1994).

Grupo 2 . - En los que hay 12 AcM's, 10 de ellos de origen murino, que reaccionaron con todas las cepas probadas de FPC y con ninguna de los restantes Pestivirus; 7 de ellos reconocen el dominio A de la gp55, y los 3 restantes a los distintos dominios de la gp55. Los 2 AcM de origen porcino, muestran una buena especificidad al VFPC (Zamora *et al*, 1994).

Grupo 3 . - Con 2 AcM's con alta especificidad frente a la cepa vacunal China de FPC (Zamora *et al*, 1994).

Grupo 4 . - Que cuenta con AcM's específicos para DV2/BD, que reconocen la mayoría de las cepas de DV2 y BD (Zamora *et al*, 1994).

En el panel mencionado, también se incluyen AcM que reconocen epítomos específicos en p125/80 y gp48 del VDVB (Zamora *et al*, 1994).

1.8 Diagnóstico. - Todos los cuadros clínicos de la FPC son de difícil reconocimiento, y por lo tanto requieren de técnicas precisas de diagnóstico de laboratorio, que son realizadas en los laboratorios de diagnóstico especializado. El diagnóstico clínico diferencial de la FPC ofrece grandes dificultades, ya que la FPC puede ser confundida con enfermedades de muy variada etiología (Van Oirschot, 1992); existen varias pruebas de laboratorio para confirmar el diagnóstico de la FPC, que básicamente están basados en la detección del antígeno viral, aislamiento e identificación del virus o en la demostración de anticuerpos (Van Oirschot, 1992). La detección de anticuerpos específicos contra el virus de la FPC es de gran utilidad para detectar la actividad viral del VFPC patógeno en áreas donde la vacunación no es practicada; la realización de pruebas serológicas es imperativa, si un país desea ser reconocido internacionalmente como libre de FPC, y en donde sí se vacuna puede algunas veces ser necesaria la diferenciación entre virus de campo y virus vacunal (Van Oirschot, 1992); la detección del virus se hace fundamentalmente por Inmunofluorescencia Directa (IFD) (Romero *et al*, 94; Coba y Correa, 1993; Van Oirschot, 1992), y esta misma técnica puede utilizarse para diferenciar entre los VFPC y de BVD; usando conjugados preparados con AcM, uno de ellos dirigido contra un epítome conservado de FPC, y el otro contra la mayoría de las cepas de FPC de campo, pero no con cepas vacunales de FPC. Una reacción positiva ante el primer monoclonal y negativa contra el segundo indicará que un virus vacunal puede estar presente; los virus lapinizados de FPC, se distinguen de los virus de campo porque inducen fiebre y estimulan la producción de anticuerpos contra FPC, al inocular conejos por vía intravenosa (Van Oirschot, 1992)

El VFPC puede ser aislado inoculando células PK-15 con una molienda al 2 % de un homogenizado de tonsilas y bazo de un caso sospechoso, y después de 24-72 horas los cultivos celulares se examinarán por IFD; la técnica de aislamiento es más sensible que la de tinción de tejidos congelados (Van Oirschot, 1992; Romero *et al*, 1998). La prueba de Inmunoperoxidasa aplicada en cortes de tejidos (IP)(Romero *et al*, 1994) también es útil, pero al igual que otras pruebas, puede reconocer también los anticuerpos inducidos por el VBVD, la prueba puede desarrollarse también en cultivos celulares, y se tiene el reconocimiento del antígeno viral en el citoplasma de las células infectadas, y la tinción puede ser examinada con un microscopio óptico (Sandvik, 1997). Mediante la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)(Van Oirschot, 1992, Wirz *et al*, 1993), se puede detectar el VFPC y, se puede también diferenciarlo de otros pesúvirus, ésta técnica tiene una sensibilidad comparable a la del aislamiento del virus en cultivos celulares y a la prueba de detección del antígeno por la prueba de IFD (Wirz *et al*, 1993), también se puede usar la técnica de ELISA por captura de antígeno (Romero *et al*, 1994)

La detección de anticuerpos puede ser una herramienta útil en el diagnóstico de las granjas sospechosas, cuando la detección usual del virus ha fallado, y en los casos de aparición de la enfermedad con formas subaguda, crónica o inaparente, causadas por cepas

de baja virulencia, en las cuales el cuadro clínico que presentan los animales no resulta muy claro, y cuando la detección del antígeno no es fácil (Van Oirschot, 1992; Romero *et al*, 1994); también es de importancia y especialmente útil en las últimas fases de un programa de erradicación (cuando ya no se vacuna) para detectar hatos infectados subclínicamente. Varias pruebas están disponibles para la detección de anticuerpos, la virus neutralización (con sus varias modificaciones), técnica que valora la capacidad de los anticuerpos presentes en el suero para neutralizar la infección del virus *in-vitro* (Van Oirschot, 1992, Romero *et al*, 1994); que ha sido usada en investigaciones serológicas a gran escala. Sin embargo, esta prueba puede detectar anticuerpos contra BVD, porque algunas infecciones producidas por BVD pueden inducir bajos títulos de anticuerpos neutralizantes contra el VFPC; por lo tanto los sueros necesitan también ser probados para detectar anticuerpos contra BVD con la prueba de VN. Cuando se detectan mayores títulos de anticuerpos contra BVD que contra FPC, será una indicación de que la infección es por el virus de BVD; aunque no se puede excluir una infección concurrente con el VFPC, en tales casos se deberán probar más cerdos de la pira sospechosa.

Las pruebas de ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a una enzima), es rápido y fácil de realizar. Una de las pruebas de ELISA puede diferenciar entre los anticuerpos contra FPC y los de BVD; para ello la prueba emplea dos monoclonales dirigidos contra diferentes epitopes de la gpE1 del VFPC, debido a que ninguno de estos monoclonales reconoce al VBVD, la posibilidad de que se detecten anticuerpos contra BVD es virtualmente insignificante. Esta prueba de ELISA es rutinariamente usada en las encuestas seroepidemiológicas (Van Oirschot, 1992). De las pruebas de ELISA las más utilizadas son las ELISAs de bloqueo, de competición o indirecto, debiendo detectar anticuerpos frente a todas las cepas del VFPC, pero a su vez evitar reacciones cruzadas con otros Pestivirus (Romero *et al*, 1994). Debido a que los anticuerpos contra las "cepas" de campo del VFPC todavía no pueden ser distinguidos de los anticuerpos vacunales, la vacunación limita la utilización de las pruebas serológicas para propósitos de diagnóstico. Recientemente se desarrolló en Europa un "kit" diagnóstico para diferenciar entre los anticuerpos estimulados contra la vacuna "Porcitis Pestis" y los anticuerpos estimulados contra el virus de campo. Sin embargo este "kit" diferencial aún no ha sido estudiado en nuestro medio en cuanto a su sensibilidad y su especificidad (Correa, 1998). Y una ELISA de competición CT-B, desarrollada en Lelystad, Holanda, consistente en que el antígeno que se usa es una proteína recombinante obtenida mediante el sistema de Baculovirus en cultivo de células de insecto (Romero *et al*, 1994; Hulst *et al*, 1993), y en la cual se usan dos AcM's que reconocen diferentes epitopes de la proteína E2 (Hulst *et al*, 1993).

La prueba de IP para la detección de anticuerpos contra el VFPC, se realiza en monocultivos de líneas celulares sensibilizadas con el VFPC. Los anticuerpos específicos contra FPC, que estén presentes en el suero sanguíneo, efectuarán la unión antígeno-anticuerpo. Un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa se fija a la porción fijadora del complemento de los anticuerpos permitiendo la reacción enzimática al agregar el sustrato. La peroxidasa activa al indicador por lo que el citoplasma de las células debe mostrar una coloración específica, en caso de haber anticuerpos contra el virus de la FPC en el suero problema. La dilución del suero problema es de 1:10, y la reacción será positiva si los pozos que contienen las células infectadas, muestran células teñidas de color café-rojizo en su citoplasma y el núcleo permanece sin tinción (Ramírez *et al*, 1998).

1.9 Distribución de la FPC.- Desde el punto de vista geográfico, el VFPC tiene una distribución mundial, aunque existen algunos países que se han declarado libres de FPC. En México, a partir de la publicación del Acuerdo y Programa de la Campaña contra FPC, en 1980, se aplicaron programas anuales de vacunación en varias etapas, declarándose libres 58 municipios del norte de Sonora en 1983. A partir de 1990 se reiniciaron los trabajos de erradicación (Mendoza, 1995). Desde 1993 los estados de Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Querétaro, Puebla y Tlaxcala se encuentran en Fase intensiva de la Campaña; y se realizan programas anuales de vacunación intensiva en los estados de Morelos, Hidalgo, México y San Luis Potosí; el resto de los estados se encuentran en etapa de control (Mendoza, 1995).

En México la FPC se ha considerado como un problema de sanidad animal grave, para la porcicultura nacional, tanto desde el punto de vista epizootológico, como por el impacto económico que ha representado. Conforme se ha ido avanzando en la Campaña Nacional de Erradicación, se han logrado limpiar de esta enfermedad la Península de Baja California y áreas amplias del Norte, y del Sureste del país, que abarcan cuencas porcícolas importantes, en las cuales ya no se presentan los brotes producidos por el virus virulento de FPC. Hasta el año de 1999 se tienen en fase de erradicación a 9 estados del Centro del país, y es en ésta zona donde se han presentado algunos brotes de FPC. En el año de 1997, el número de casos se incrementó, teniéndose 162 casos, determinándose que el 87 % de estos casos ocurrieron en cerdos de traspatio. De acuerdo a un estudio realizado sobre estos brotes, se determinó que los factores de riesgo responsables del incremento en el número de casos, fue la movilización de cerdos susceptibles del área en Erradicación, en donde ya no se vacuna, hacia el área en Control, infectada con el VFPC; aunado al bajo nivel de inmunidad en los cerdos de traspatio. Por lo que se estableció que la población de cerdos de traspatio en el área en Control fue el principal reservorio del virus, implementándose una campaña intensiva de vacunación de éstos cerdos para reducir la circulación de virus en esta área de Control, teniéndose una disminución en el número de casos de FPC en 1998 (Estrada *et al*, 1998), con un total de 104 casos, durante ese año (Acevedo, 1998).

1.10 Justificación.- Esta situación hace evidente la necesidad de buscar con una prueba serológica que pudiera ser una alternativa para el diagnóstico, a través del uso del reconocimiento de diferentes proteínas virales de una cepa vacunal y de una cepa de referencia, que nos permitiera, a través del uso de ésta, ver alguna diferencia entre ambas cepas. En varias enfermedades infecciosas, en las que el diagnóstico se basa en la detección de anticuerpos, las técnicas de confirmación se utilizan en forma rutinaria, y muchas técnicas en la actualidad se basan en general en la detección de las proteínas específicas, de los agentes infecciosos, cuando reaccionan con los sueros positivos a dichos agentes infecciosos. Las pruebas más empleadas para la detección de proteínas virales son las de "immunoblot" y la de radioinmunoprecipitación; sin embargo, la de "immunoblot" ofrece una mayor sensibilidad y objetividad de interpretación (Escobedo *et al*, 1990). La detección de anticuerpos específicos por análisis de "Western blot" (WB) es una variedad de las pruebas de inmunofluorescencia indirecta (IFD), IF, y ELISA, las cuales dan información sobre la especificidad molecular de un suero (Santóvik, 1997). Por esta razón el propósito de este trabajo es trabajar con la prueba de inmunotransferencia para, contar con una prueba serológica que pudiera darnos información sobre la capacidad de los sueros policlonales producidos por una parte en de animales vacunados y por otra en animales inoculados con

una dosis mínima de una cepa patógena de FPC, para poder determinar si dichos sueros pueden reconocer o no las proteínas de las cepas del VFPC estudiadas, y poder observar si hay alguna o varias proteínas en las cepas de FPC estudiadas; con el propósito de poder diferenciar ambas cepas

2.0 OBJETIVO GENERAL :

Determinar mediante pruebas de electroforesis e inmunotransferencia si se observan o no diferencias entre la cepa vacunal PAV-250 y la cepa ALD de FPC al utilizar sueros de cerdos vacunados, vacunados e infectados, y solo infectados.

2.1 OBJETIVOS PARTICULARES :

- Producir sueros inmunes en cerdos, contra la cepa patógena ALD y contra la cepa vacunal PAV-250.
- Evaluar y comparar el patrón electroforético de cada una de las cepas en estudio.
- Realizar pruebas de inmunotransferencia para tratar de detectar si hay diferencias entre las dos cepas, empleando los sueros de los animales desafiados y vacunados e infectados y vacunados.
- Evaluar la respuesta dinámica serológica de los animales desafiados y vacunados e infectados y sólo vacunados.

CUADRO 1. DETERMINACION DE LA DOSIS INMUNIZANTE DE LA CEPA PATOGENA ALD DE FFC.

DIA EXPERIMENTO	DEL DILUCION INOCULADA	DOSIS / IM
1	10^{-11}	1 ml
3	10^{-10}	1 ml
6	10^{-9}	1 ml
8	10^{-8}	1 ml
10	10^{-7}	1 ml
13	10^{-6}	1 ml
15	10^{-5}	1 ml
17	10^{-4}	1 ml
20	10^{-3}	1 ml
23	10^{-2}	1 ml
24	10^{-1}	1 ml

* IM = Intramuscular

centinelas no se les aplicó ningún tratamiento, y solamente se les permitió que estuvieran en contacto permanente con los cerdos de su grupo correspondiente. Todos los cerdos fueron observados clínicamente durante el desarrollo del experimento, determinándose su temperatura rectal; y todos fueron sangrados al primer día del experimento (antes de la vacunación) para obtener suero sanguíneo, y después cada cinco días, hasta el día 30. Este día todos los cerdos fueron sacrificados, incluyendo aquellos cerdos del Grupo III que sobrevivieron ante la inoculación con el virus patógeno ALD; el sacrificio fue realizado mediante el sangrado en blanco, y se realizó la necropsia para observar las lesiones y para coleccionar las muestras de tejidos para los estudios confirmativos de virología. El suero obtenido de cada uno de los cerdos, en cada uno de los muestreos, fue identificado y almacenado a -20 C hasta ser estudiado.

3.4 Serología. - A los cerdos de los cinco grupos formados, se les tomó una muestra de sangre, para la obtención de suero sanguíneo, antes de ser vacunados e inoculados, para checar que fueran serológicamente negativos al VFPC; y posteriormente se tomaron muestras de sangre cada cinco días, hasta el día 30 del experimento, obteniéndose siete muestreos, correspondientes a los días uno, cinco, 10, 15, 20, 25 y 30. Con los sueros obtenidos se realizó la prueba cualitativa de inmunoperoxidasa (IP), para detectar la presencia o ausencia de anticuerpos contra el VFPC (Ramírez *et al*, 1998).

3.5 Comparación del patrón electroforético de las cepas en estudio. - Para evaluar y comparar el patrón electroforético de cada una de los virus de FPC empleados, se utilizaron los siguientes cepas y controles: a) el virus vacunal PAV-250; b) el virus patógeno ALD de FPC; c) el medio de cultivo (GIBCO BRL, Catálogo 41500-067); d) células PK-15 no inoculadas y lisadas por sonicación, las cuales fueron previamente lavadas con PBS 1X estéril, para remover los restos de células muertas, y para retirar el medio de cultivo, después fueron centrifugadas y resuspendidas en PBS 1X, y entonces fueron sonicadas a tres ciclos de tres minutos, a una velocidad de 60 ciclos por segundo; y e) suero fetal bovino (SFB) (GIBCO BRL, Catálogo 16000-036), diluido 1:50. Lo descrito en los incisos c), d) y e) se utilizó en el experimento como controles, para compararlos con el patrón de proteínas de las cepas en estudio. De todas éstas muestras así obtenidas, se procedió a determinar la concentración de proteína, con base en el método de Bradford (1976).

Por lo cual se obtuvo primeramente una curva con albúmina sérica bovina, a varias concentraciones, para utilizarlas como punto de comparación, para determinar la concentración de proteínas y la lectura se realizó a una longitud de onda de 595 nm, en un espectrofotómetro (Beckman, Modelo DV64). La proteína de cada muestra fue ajustada a $1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$, y con cada muestra se realizó la prueba de electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) con dodecilo sulfato de sodio (SDS), bajo condiciones reductoras, de acuerdo a la técnica de Laemmli (1970). Para la preparación del gel (al 12.5 %), para el gel concentrador (al 5%), para las soluciones reguladoras del corrimiento electroforético y para la muestra con la solución digestora (2-mercaptoetanol); se prepararon las siguientes soluciones a) solución de monómeros, acrilamida-bis acrilamida (30.8% y 2.5%); b) regulador del gel de separación Tris-HCl (1.5 M pH 8.8); c) regulador del gel concentrador (Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8); d) Lauril sulfato de sodio (SDS) (al 10%); e) persulfato de amonio al 10 %; f) TEMED (N'N'N'N' Tetrametilenediamina); g) solución amortiguadora para el corrimiento (Tris

0.025 M, glicina 0.192 M-SDS al 0.1 %, pH 8.3); y h) la solución digestora. Para el corrimiento de los geles se preparó el gel tapón, el gel de separación (del 12.5 %) y el gel concentrador para el peine.

3.5.1 Preparación de los geles - Para preparar los geles tapón (tanto el de separación como el concentrador), la mezcla realizada se virió rápidamente a la cámara de electroforesis, previamente preparada (Modelo No. SE250, Hoefer Scientific Instruments), y se colocó rápidamente un ml aproximadamente de isopropanol sobre la superficie. Cuando la gelificación se llevó a cabo se observó una interfase definida entre el isopropanol y el gel, para lo cual se retiró el isopropanol y se enjuagó con agua y se escurrió. Posteriormente se colocó la mezcla del gel concentrador, de igual forma, y luego se colocó la solución para el peine, y el peine, el cual se retiró cuando el gel se había polimerizado, quedando de esta forma los pozos bien definidos.

3.5.2 Preparación y corrimiento de las muestras. - Se colocó un volumen de 25 μ l de cada una de las muestras, conteniendo 1 μ g/ μ l de proteína, en un tubo eppendorf (un tubo para cada muestra) y además el mismo volumen de la solución digestora; se mezcló y se hirvió en Baño de María por tres minutos, para desnaturalizar las proteínas. Antes de correr el gel, se realizó una precorrida durante 30 minutos a 15 miliamperes (mamp). Posteriormente, utilizando una jeringa Hamilton, se colocaron 15 μ l de cada una de las muestras en los carriles hechos en el gel de concentración, junto con las muestras problema, en cada carril se colocaron 10 μ l de una muestra de proteínas de PM conocido (205,000 d, miosina de músculo de conejo; 116,000 d, B-Galactosidasa *E. Coli*; 97,400 d, Fosforilasa b de músculo de conejo; 66,000 d, Albúmina sérica bovina; 45,000 d, Ovoalbúmina de huevo de gallina; 29,000 d, Anhidrasa carbónica de eritrocitos de bovino). Esto fue con el fin de tomarlas como controles, para comparación. Las muestras fueron corridas utilizando una fuente de poder mod. PS250/25 amperios (amp) (Hoefer Scientific Instruments) a 15 amp constante, por tres a cuatro horas, hasta el momento en que el colorante que sirvió de referencia llegó al final del gel de separación.

Terminado el corrimiento, el gel se colocó en una solución de metanol al 50%, toda la noche, para fijarlo y después se procedió a tefir los geles con la tinción de Nitrato de Plata, de acuerdo a la técnica de Hitchcock y Brown (1983), (Tsai y Frash, 1982).

3.5.3 Tinción de los Geles con Nitrato de Plata. - Para realizar la tinción se prepararon las siguientes soluciones: a) NaOH 0.1 M (30 ml); b) NH_4OH (3ml); c) AgNO_3 (1gr) (éste último se disolvió por separado en cinco ml de agua desionizada). Los tres reactivos mencionados se disolvieron en 115 ml de agua desionizada, agregando el NaOH y el NH_4OH lentamente, para evitar que se precipitara el AgNO_3 . El gel se sacó de la solución fijadora y se dejó 30 minutos en agitación con agua desionizada, después se retiró el agua y el gel se tñó con la solución de nitrato de plata (anteriormente mencionada), por 30 minutos en agitación rápida; después se le dieron tres lavados de un minuto en agua desionizada.

Posteriormente se realizó el revelado con ácido cítrico (0.05 gr), formaldehído (1ml) y agua desionizada (obp lit) Al observarse las bandas, se paró la reacción durante una

hora con la solución de 200 ml de agua desionizada, más 10 ml de ácido acético glacial (al 7%)

Al terminar lo anterior los geles se lavaron con agua desionizada.

Después del proceso de tinción, el gel fue secado con papel celofán, para su conservación. Se determinó así la movilidad relativa (Rf) de cada banda observada, para determinar su PM, en base a la ecuación de regresión, que se obtuvo a partir de los resultados, mediante la fórmula siguiente

$$\text{Movilidad relativa} = \frac{\text{Tamaño del gel}}{\text{Distancia de migración del frente del colorante}}$$

3.6 Pruebas de inmunotransferencia.- Para realizar las pruebas de inmunotransferencia con cada una de las cepas (PAV-250 y ALD) y los sueros inmunes contra ellas se realizó lo siguiente: Electrotransferencia.- Se prepararon geles de poliacrilamida al 12.5 % (SDS-PAGE) con un peine continuo, para el corrimiento de cada una de las cepas, de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente. Posteriormente se realizó la transferencia de acuerdo a la técnica de Towbin, *et al* (1979). Para lo cual se cortaron pedazos de papel de nitrocelulosa (Immobilon-2, Millipore Corporation, Bedford, MA), de poro de 0.45 μm , del tamaño del gel (se trabajó con guantes, para evitar dejar huellas en el papel de nitrocelulosa). Antes de usar el papel, éste se sumergió algunos segundos en metanol, para activarlo; así mismo, se cortó papel filtro del mismo tamaño, que el del papel de nitrocelulosa

En un recipiente se humedecieron las fibras, con el amortiguador de transferencia (Tris 25mM (pH8.3); glicina 0.192 M, SDS, 0.1 %, Metanol al 20%) Se tomó un "cassette" del aparato de electrotransferencia (TE22 Mighty Small Transphor, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA), y se preparó, de abajo hacia arriba, como a continuación se explica se colocó primeramente el acrílico, luego la fibra, el papel filtro, el papel de nitrocelulosa, el gel de poliacrilamida, papel filtro, fibra y el otro acrílico (cuidando de que en este proceso no se formarán burbujas entre el papel filtro y el gel), y todo se cubrió con el amortiguador de transferencia (sistema: metanol-tris-glicina); se pusieron marcas con lápiz en el papel de nitrocelulosa, para marcar el tamaño del gel y para determinar en dónde se inició el corrimiento del gel; se cerraron los seguros del "cassette" de modo que todo quedara firmemente aprisionado, y nuevamente se cubrió todo con el amortiguador de transferencia. El "cassette" formado se colocó en la cámara de transferencia, se llenó con el amortiguador de transferencia, y se colocaron los electrodos, de modo que el cátodo (polo negativo) quedara del lado del gel, y se conectó al sistema de la fuente de poder (EC-135 E-C-Apparatus Corporation, St. Petersburg, Florida). La transferencia se realizó a 8 mamp, con voltaje constante toda la noche, con agitación constante (con un PCM-Agitador magnético) y con refugio de agua fría. Al término de cada transferencia, se marcó el tamaño y posición del gel en el papel de nitrocelulosa, así como la colocación de los marcadores de PM de referencia, y para poder detectar las proteínas transferidas, se cortó el pedazo donde se colocaron los marcadores de PM y se tiñeron con la tinción de negro de amido.

3.6.1 Tinción con Negro de Amido.- Se procedió a preparar lo siguiente: solución negro de amido (0.1 gr), Met-OH (54 ml), ácido acético glacial (10 ml) y agua desionizada (cóp 100 ml), así como la solución desestofadora I (metanol, ácido acético glacial y agua desionizada) y la solución desestofadora II (metanol, ácido acético glacial y agua desionizada). Se sumergió el papel de nitrocelulosa en la solución de negro de amido por 5 minutos, luego se lavó con agua desionizada por 1 minuto, después se lavó con la solución desestofadora I, por dos horas, y finalmente se lavó con la solución desestofadora II, durante el tiempo suficiente para poder observar claramente las bandas de proteína de los marcadores de PM. Realizadas las transferencias con cada una de las cepas en estudio y comprobada la transferencia de las proteínas de los marcadores, se procedió a cortar el papel de nitrocelulosa en tiras de dos mm de ancho, para poder realizar con ellos la prueba de inmunotransferencia.

3.6.2 Inmunotransferencia.- Para realizar esta prueba se prepararon las siguientes soluciones: a) solución amortiguadora de trietanolamina (TBS) pH 7.2; b) solución de caseinato de calcio al 5 % en TBS; y c) la solución reveladora (Alfa-cloronaftol-sustrato).

3.6.3 Sueros problema.- Se usaron los sueros que fueron obtenidos a partir de los cinco grupos de los cerdos correspondientes a los siete muestreos; los cuales se confrontaron con la cepa ALD y con la cepa PAV-250.

Las tiras obtenidas del papel de nitrocelulosa se identificaron con el número del cerdo (número del suero) y del muestreo correspondiente, para después proceder a realizar el bloqueo de cada tira, al cual se llevó a cabo con caseinato de calcio al 5 % de acuerdo al siguiente procedimiento:

- a) Se colocaron las tiras de papel de nitrocelulosa en las placas especiales para teñirlas.
- b) Las tiras de papel, se activaron, antes de bloquearlas, sumergiéndolas unos segundos en metanol.
- c) Se colocaron dos ml de caseinato de calcio, sobre cada tira, permitiendo que se humedecieran bien, y se dejaron en agitación continua por 10 minutos.
- d) Se hicieron cinco lavados (cambiando cada vez la solución de lavado) y se dio un lavado final durante cinco minutos, en agitación constante.
- e) Continuando con el bloqueo de las tiras, se adicionó después un ml de suero de conejo diluido 1:20, y se dejó en agitación durante 30 minutos, a temperatura ambiente.
- f) Se hicieron, nuevamente cinco lavados rápidos y un lavado final de cinco minutos, en agitación constante.
- g) Se adicionó después, un ml del suero problema, diluido 1:20 (la decisión de usar la dilución de 1:20 fue tomada con base en un experimento previo), en el cual primero fue adsorbido con células PK-15 no inoculadas, la adsorción hecha por 30 minutos, a 37 C. El suero se dejó reaccionar con las tiras de papel de nitrocelulosa por una hora, en agitación constante, a temperatura ambiente.
- h) Se realizaron cinco lavados rápidos, y un lavado final de cinco minutos, en agitación constante.

- i) Se adicionó posteriormente un ml de los anticuerpo secundario (anti IgG-SIGMA), el cual fue diluido 1:400 (previamente fue adsorbido con células PK-15 no inoculadas, por 30 minutos, a 37 C), dejando reaccionar el anticuerpo con las tiras de papel de nitrocelulosa por una hora , en agitación permanente , a temperatura ambiente.
- j) Posteriormente se hicieron cinco lavados y un lavado final de cinco minutos, en agitación continua.
- k) Después se llevó a cabo el revelado, utilizando la solución del substrato (Alfacionaftol), adicionando un ml de esta solución a cada tira, y dejándola reaccionar por 20 minutos, o hasta ver claramente la aparición de las bandas.
- l) Finalmente las tiras de papel de nitrocelulosa, ya teñidas con el substrato, se lavaron con agua destilada y se dejaron secar. Al finalizar todo lo anterior, se procedió a realizar la lectura de todas las bandas, correspondientes a ambas cepas (PAV-250 y ALD). Y al igual que en las pruebas de electroforesis, se determinaron los valores de Rf para cada prueba, para así poder determinar el PM de cada banda observada.

3.6.4 Tablero de ajedrez.- El suero problema y el anti-anticuerpo IgG peroxidado tuvieron que ser probados y estandarizados para obtener la dilución óptima de trabajo, para la prueba de inmunotransferencia.

4. RESULTADOS.

4.1 Virus de FPC.- El título obtenido por la técnica de IP, para la cepa vacunal PAV-250 utilizada en este experimento fue de $10^{3.8}$ DICC₅₀ / 0.2 ml., y en el caso de la cepa patógena ALD fue de $10^{3.3}$ DICC₅₀ / 0.2 ml.

4.2 Determinación de la dosis mínima infectante no letal de la cepa virulenta ALD.

Los cerdos del ensayo preliminar que fueron inoculados con las diluciones cada vez más concentradas de la cepa ALD, manifestaron elevación de temperatura a partir del día 24 postinoculación; o sea a los cuatro días después de que se les aplicó la dilución $10^{3.0}$, y a los siete días de que se aplicó la dilución $10^{4.0}$ (Cuadro 2 y Figura 3), y los dos mostraron signos clínicos de FPC, los cuáles fueron: elevación de la temperatura, anorexia, postración, hacinamiento, pelo hirsuto, lordosis, signos nerviosos, movimientos tónico clónicos (bicieleteo) parpadeo continuo, congestión de la conjuntiva ocular, cianosis de la piel de las orejas, flancos hundidos; uno de ellos murió el día 30, y el otro mostró hipotermia, diarrea y murió a los 38 días postinoculación. En base a lo anterior se determinó usar la dilución $10^{4.0}$ / ml para inocular a los cerdos del experimento de la etapa subsiguiente.

4.3 Inmunización de los cerdos.- Durante el desarrollo del experimento se observó lo siguiente:

Grupo I.- Controles negativos: los cerdos permanecieron normales sin mostrar elevación de temperatura rectal, ni signos clínicos (Cuadro 3 y Figura 4), y a la necropsia no mostraron lesiones (Cuadros 8, 9 y 10).

Grupo II.- Vacunados con una dosis de PAV-250: no hubo elevación de temperatura rectal, excepto en un cerdo (Cuadro 8), que mostró una elevación de 0.4 C (40.4 C) únicamente durante el día tres del experimento (Cuadro 4 y Figura 5); en los centinelas puestos en contacto, no hubo hipotermia, ni presencia de signos atribuibles a la FPC (Cuadros 4 y 8). En la necropsia, realizada a los 30 días postvacunación, solamente en tres cerdos (dos cerdos vacunados (seis y siete), y el centinela número nueve), los ganglios se encontraron ligeramente hemorrágicos (Cuadros 9 y 10).

Grupo III.- Inoculados con la cepa virulenta ALD: todos los cerdos mostraron hipotermia, uno (No. 49) a partir del quinto día postinoculación; dos (Nos. 30 y 31), desde el día 10; y los dos restantes desde el día 11 postinoculación, los cerdos centinelas (Nos. 33, 34), mostraron también hipotermia a partir de los días 13 y 14 postinoculación (Cuadro 5 y Figura 6); los cerdos presentaron los signos clínicos de FPC (Cuadro 8) entre los dos y tres días después de iniciada la hipotermia (Cuadro 5), y al igual que los cerdos centinelas, un cerdo (No. 49) murió el día 10 (padeciendo por cinco días los signos de la FPC), y dos murieron el día 16 (Nos. 30 y 32) (después de seis días con signos, respectivamente). Al realizar la necropsia, todos los cerdos (inoculados y centinelas) mostraron lesiones de FPC (Cuadro 9 y 10).

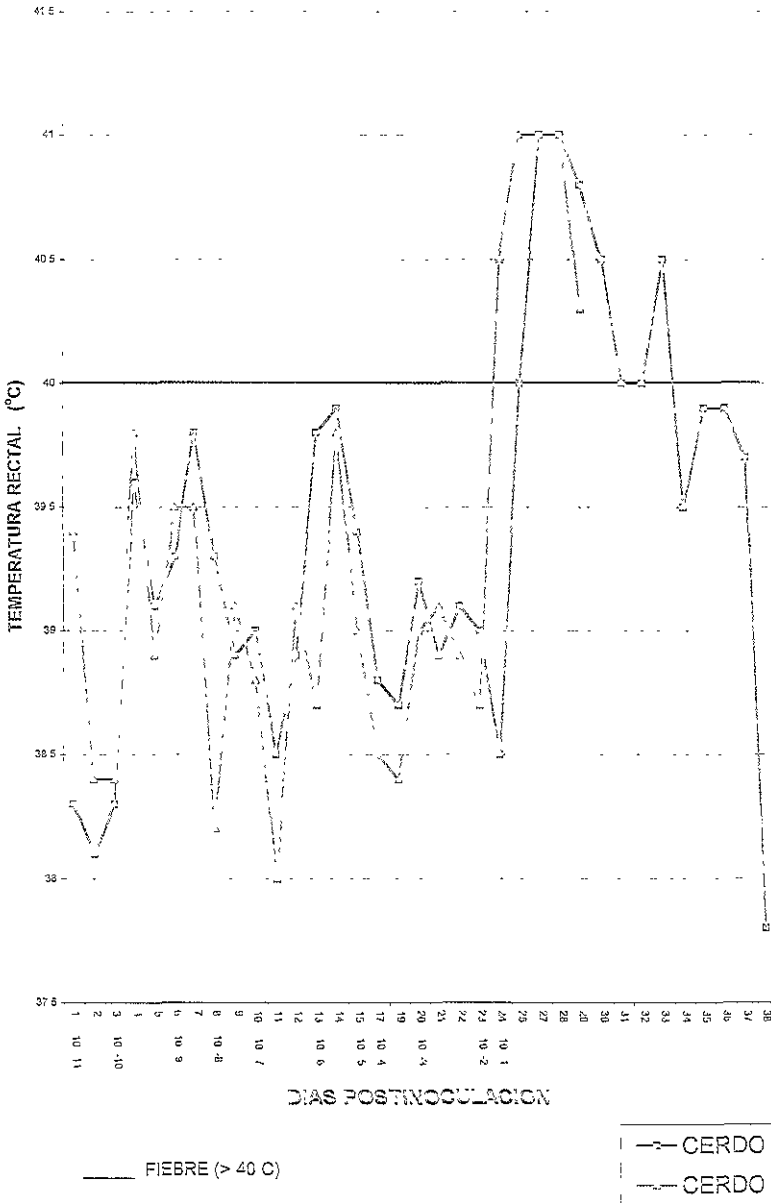
CUADRO 2. DETERMINACION DE LA DOSIS MINIMA INFECTANTE DE LA CEPA PATOGENA ALD-FPC.

TEMPERATURA RECTAL (C)

DIAS	CERDO 1	CERDO 2
1	38.3	39.4
2	38.1	38.4
3	38.3	38.4
4	39.6	39.8
5	39.1	38.9
6	39.3	39.5
7	39.8	39.5
8	39.3	38.2
9	38.9	39.1
10	39.0	38.8
11	38.5	38.0
12	38.9	39.1
13	39.8	38.7
14	39.9	39.8
15	39.4	39.0
16	S/D	S/D
17	38.8	38.5
18	S/D	S/D
19	38.7	38.4
20	39.2	39.0
21	38.9	39.1
22	39.1	38.9
23	39.0	38.7
24	38.5	40.5
25	40.0	41.0
26	S/D	S/D
27	41.0	41.0
28	41.0	41.0
29	40.8	40.3
30	40.5	S/T
31	40.0	M
32	40.0	-
33	40.5	-
34	39.5	-
35	39.9	-
36	39.9	-
37	39.7	-
38	37.5 - M	-

S/D = Sin determinar ; S/T = Sin registrar temperatura rectal ; M = Muerto

FIGURA 3. TEMPERATURA DE LOS CERDOS E INOCULACIONES DURANTE LA DETERMINACIÓN DE LA DOSIS MÍNIMA INFECTANTE DE LA CEPA ALD-FPC



CUADRO 3. GRUPO I. - TEMPERATURA RECTAL PROMEDIO DE LOS CERDOS CONTROLES NO INOCULADOS.

CERDO	DIAS 1	2	3	4	5
X	39.3	38.9	39.7	39.7	39.3
DESV. ESTAND.	3872	.6652	3464	3162	.3774

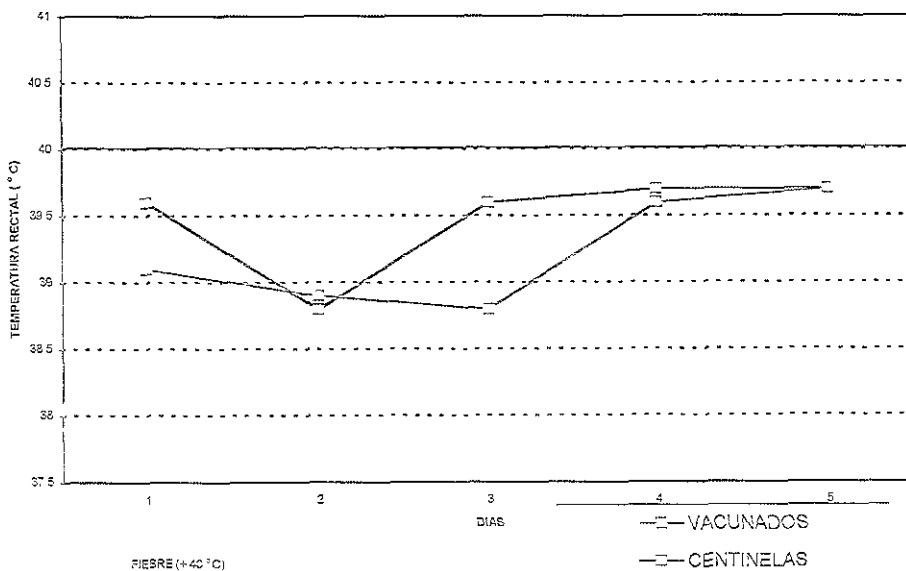
FIGURA 4. GRUPO I. - TEMPERATURA RECTAL PROMEDIO DE LOS CERDOS CONTROLES NEGATIVOS



CUADRO 4. GRUPO II.- TEMPERATURA RECTAL PROMEDIO DE LOS CERDOS VACUNADOS CON UNA DOSIS DE LA VACUNA PAV-250.

CERDO VACUN.	DIAS POS VAC	1	2	3	4	5
X		39.6	38.8	39.6	39.7	39.7
DES. ESTAND.		5377	.8426	6344	.3201	1154
CERDOS CENTS						
X		39.1	38.9	38.8	39.6	39.7
DES. ESTAND.		2828	2121	.4949	2121	.0707

FIGURA 5. GRUPO II.- TEMPERATURA RECTAL PROMEDIO DE LOS CERDOS VACUNADOS CON UNA DOSIS DE LA VACUNA PAV-250



Grupo IV.- Vacunados con una dosis de la cepa PAV-250 y expuestos con la cepa patógena ALD: los cerdos permanecieron normales excepto dos cerdos (Nos. 37 y 38) que mostraron ligera hipertermia (40.0 y 40.3 C, respectivamente) durante el día 16 postdesafío; sin mostrar otros signos (Cuadro 6 y Figura 7). A la necropsia de los vacunados y expuestos hubo escasas lesiones, en uno (No. 37) infartos en regresión en el bazo, en los demás cerdos de este grupo, no hubo cambios patológicos importantes aparentes, excepto escasas pettequias en la mucosa de la vejiga urinaria (Cuadros 9 y 10). En los cerdos centinelas, sólo uno (No. 54), presentó hipertermia (40.0 y 40.3 C) los días 13 y 14 postinoculación, también mostró anorexia, depresión e hipotermia y murió el día 16, presentando signos y lesiones de FPC; el otro centinela (No. 40), no mostró hipertermia, pero a la necropsia presentó ligeras lesiones de FPC (congestión en válvula ileocecal, infartos en el bazo, y pettequias en la mucosa de la vejiga urinaria) (Cuadros 8, 9 y 10).

Grupo V.- Vacunados con dos dosis de la cepa PAV-250 y desafiados con la cepa patógena ALD: no se observó hipertermia en los cerdos (Cuadro 7 y Figura 8), excepto en el cerdo No. 43 en el que hubo ligera hipertermia (40 C) durante el día 16 postinoculación, ninguno murió, y a la necropsia (Cerdos Nos. 42, 43, 44 y 45) hubo escasas lesiones sospechosas de FPC, en ganglios, vejiga urinaria y bazo. Los cerdos centinelas tampoco murieron, pero uno presentó elevación de la temperatura desde el día 13 al 15 postinoculación; a la necropsia ambos centinelas (Nos. 46 y 47) presentaron pocas lesiones en el bazo, vejiga urinaria, riñón y ganglios submaxilares (Cuadros 8, 9 y 10).

Para realizar los estudios confirmativos de virología, se colectaron tonsilas de los diferentes grupos de cerdos, después de realizar la necropsia. Con las tonsilas colectadas, se procedió a efectuar la prueba de Inmunofluorescencia Directa, haciendo cortes de los tejidos en congelación, para lo cual se usó un conjugado específico de FPC diluido 1:60; obteniéndose los siguientes resultados: Grupo I, las tonsilas trabajadas fueron negativas; Grupo II, las tonsilas de los cerdos vacunados, colectadas a los 30 días postvacunación, fueron negativas, al igual que las de sus cerdos centinelas; Grupo III, en este caso todas las tonsilas trabajadas, procedentes de los inoculados con la cepa ALD, fueron positivas a FPC, al igual que las tonsilas de los cerdos centinelas; Grupo IV, las tonsilas trabajadas de los cerdos vacunados y desafiados fueron positivas, y negativa la que fue trabajada de los cerdos centinelas; Grupo V, las tonsilas, de los vacunados dos veces y desafiados fueron positivas y la tonsila que se trabajó del cerdo centinela fue sospechosa a FPC.

4.4. Serología.

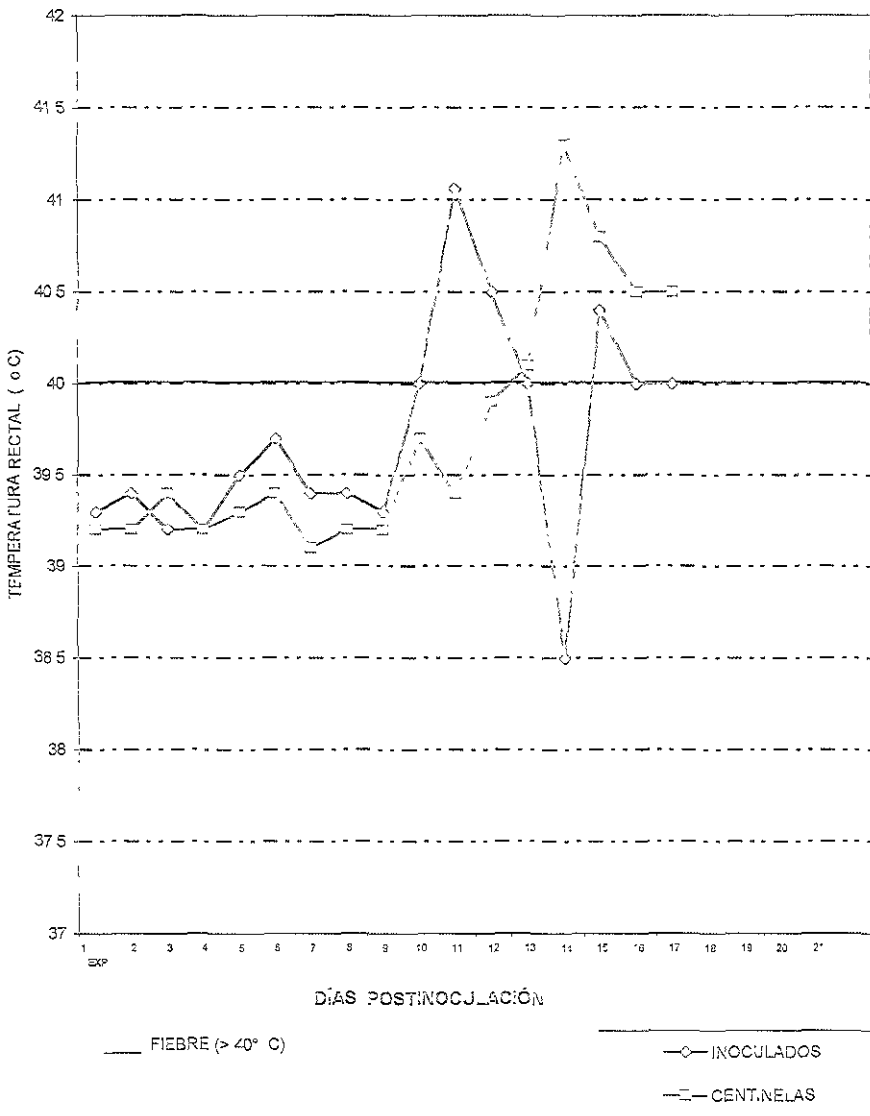
En el primer muestreo, realizado antes de ser vacunados, mediante la prueba de Immunoperoxidasa (IP) se determinó que los sueros de los cinco grupos de cerdos utilizados fueron inicialmente negativos a anticuerpos contra el VFPC. Posteriormente se determinó que los anticuerpos contra el VFPC estuvieron presentes en el Grupo II, a partir del día 15 y 20 postvacunación, manteniéndose negativos los cerdos centinelas; en el caso del Grupo III, sólo hubo anticuerpos en uno de los cuatro cerdos inoculados con la cepa patógena ALD, a partir del día 25 postinoculación; permaneciendo los centinelas negativos; en el caso de los Grupos

CUADRO 5. GRUPO III. - TEMPERATURA RECTAL PROMEDIO DE LOS CERDOS INOCULADOS CON LA CEPA PATOGENA ALD-770.

DIAS POS INOC *	CERD. INOC. X	DESV. ESTAN.	CERD. CENT. X	DESV. ESTAN.
10/1	39.3	.3947	39.2	.3535
11/2	39.4	.1825	39.2	.3535
12/3	39.2	.2886	39.4	.2828
13/4	39.2	.2217	39.2	.2121
14/5	39.5	.5909	39.3	.2121
15/6	39.7	.8808	39.4	.2121
16/7	39.4	.5887	39.1	.1414
17/8	39.4	.7187	39.2	.3535
18/9	39.3	.4203	39.2	.2828
19/10	40.0	.5131	39.7	.1414
20/11	41.06	.2081	39.4	.5656
21/12	40.5	.5507	39.9	.1414
22/13	40.0	1.1135	40.1	.4242
23/14	38.5	2.6006	41.3	.2121
24/15	40.4	.1414	40.8	.2121
25/16	40.0	-	40.5	.7071
26/17	40.0	-	40.5	.7071
27/18	S/D	S/D	S/D	S/D
28/19	S/D	S/D	S/D	S/D
29/20	S/D	S/D	S/D	S/D
30/21	S/D	S/D	S/D	S/D

* = Días postinoculación / Días correspondiente del experimento;
S/D = Sin datos. Se inocularon el día 10.

FIGURA 6. GRUPO III.- TEMPERATURA RECTAL PROMEDIO DE LOS CERDOS INOCULADOS CON LA CEPA PATÓGENA ALD-FPC

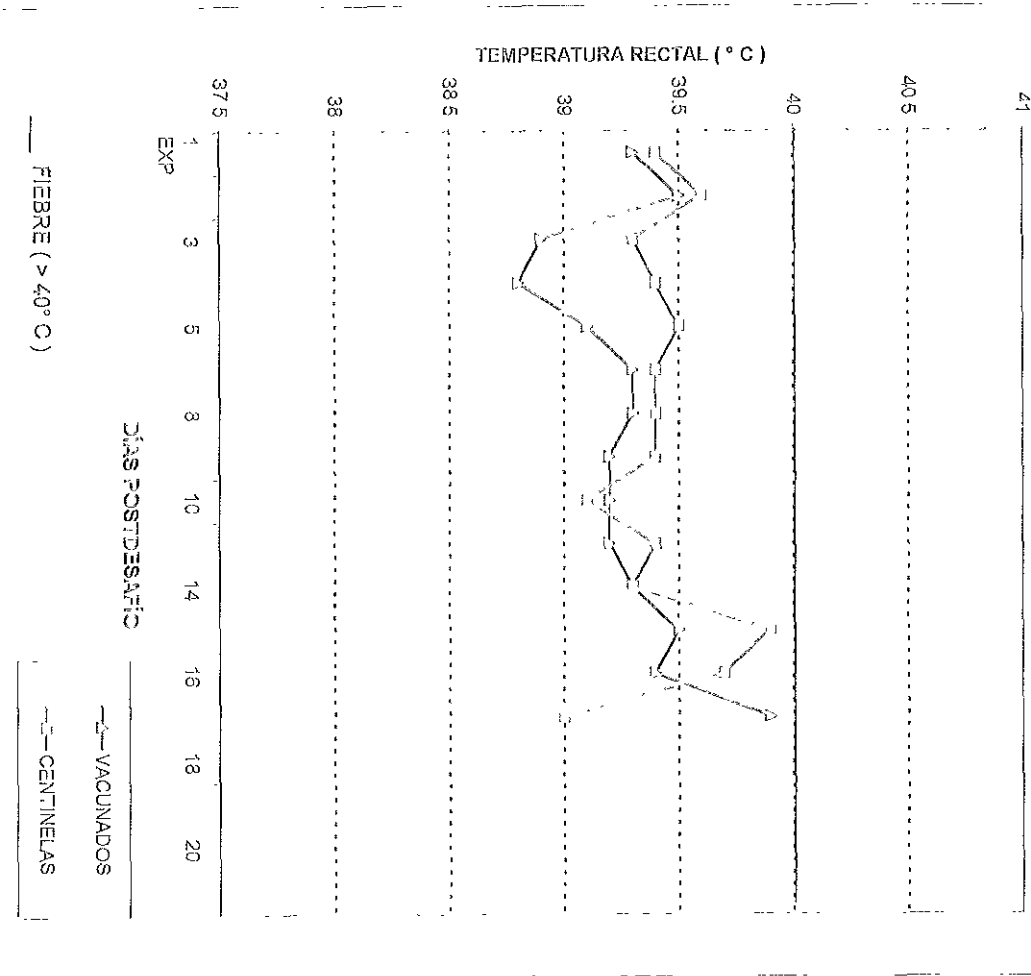


CUADRO 6. GRUPO IV. - TEMPERATURA RECTAL PROMEDIO DE LOS CERDOS PREVIAMENTE VACUNADOS CON UNA DOSIS DE LA CEPA PAV-250 Y DESAFIADOS CON LA CEPA PATOGENA ALD-7PC.

DÍAS *	CERD. VAC. X	DESV. ESTAN.	CERD. CENT. X	DESV. ESTAN.
10/1	39.3	.1632	39.4	.1414
11/2	39.5	.4349	39.6	.0707
12/3	38.9	.3403	39.3	.3535
13/4	38.8	.4434	39.4	.1414
14/5	39.1	.15	39.5	0
15/6	S/D	S/D	S/D	S/D
16/7	39.3	.2449	39.4	.1414
17/8	39.3	.1825	39.4	.2121
18/9	39.2	.3593	39.4	.0707
19/10	39.2	.5560	39.1	.1414
20/11	39.2	.3511	39.4	.1414
21/12	S/D	S/D	S/D	S/D
22/13	S/D	S/D	S/D	S/D
23/14	39.3	.4112	39.3	.4949
24/15	39.5	.2380	39.9	.4949
25/16	39.4	.2828	39.7	-
26/17	39.9	.2645	39.0	-
27/18	S/D	S/D	S/D	S/D
28/19	S/D	S/D	S/D	S/D
29/20	S/D	S/D	S/D	S/D
30/21	S/D	S/D	S/D	S/D

* = Días post vacunación / Días postdesafío; S/D = Sin datos. Se cesafió a los cerdos a los 10 días postvacunación.

FIGURA 7. GRUPO IV.- TEMPERATURA RECTAL PROMEDIO DE LOS CERDOS PREVIAMENTE VACUNADOS CON UNA DOSIS DE LA CEPA PAV-250 Y DESAFIADOS CON LA CEPA ALD-FPC



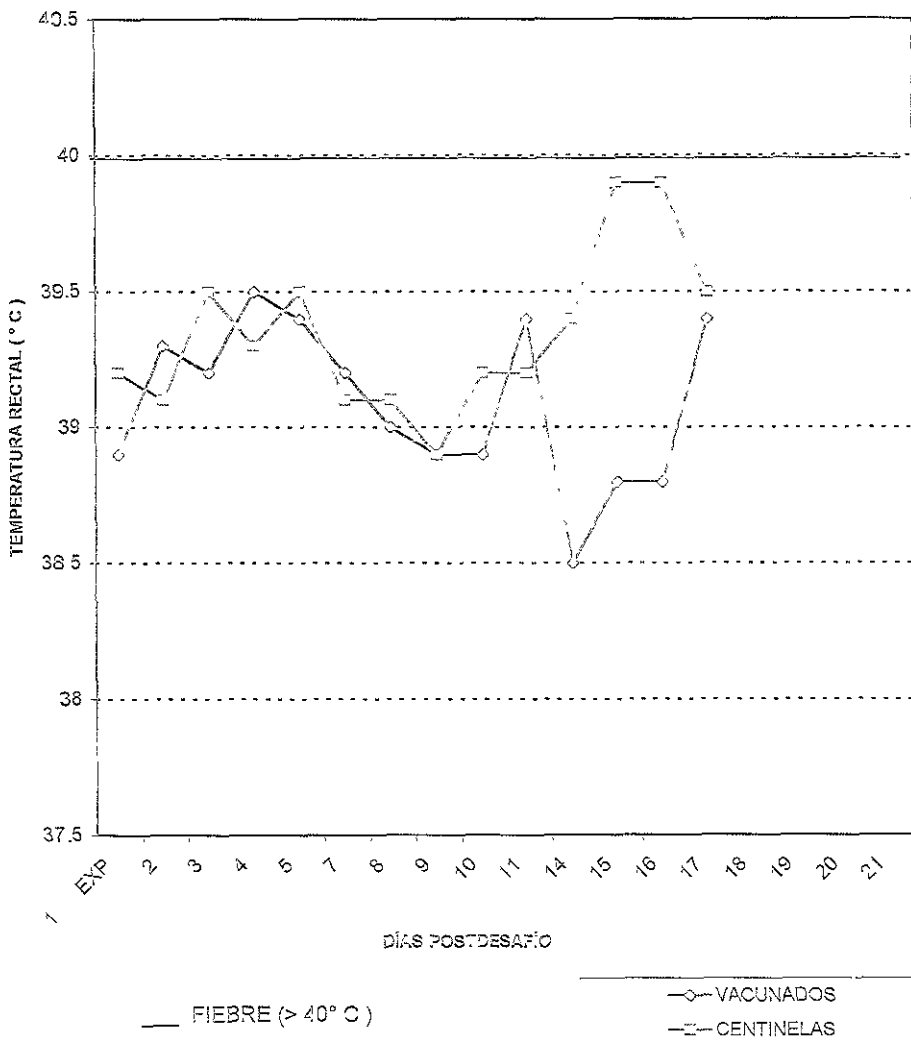
CUADRO 7. GRUPO V. - TEMPERATURA RECTAL PROMEDIO DE LOS CERDOS PREVIAMENTE VACUNADOS CON DOS DOSIS DE LA CEPA PAV-250 Y DESAFIADOS CON LA CEPA ALD-FPC.

DÍAS **	CERD. VAC. X	DESV. ESTAN.	CERD. CENT. X	DESV. ESTAN.
10*/1	38.9	.5852	39.2	.3535
11/2	39.3	.2753	39.1	.0707
12/3	39.2	.2217	39.5	.2121
13/4	39.5	.2449	39.3	.3535
14/5	39.4	.0957	39.5	-
15/6	S/D	S/D	S/D	S/D
16/7	39.2	.3862	39.1	.5656
17/8	39.0	.1707	39.1	.2121
18/9	38.9	.1732	38.9	.1414
19/10	38.8	.2645	39.2	.7071
20/11	39.6	.2449	39.2	.3535
21/12	S/D	S/D	S/D	S/D
22/13	38.9	S/D	S/D	S/D
23/14	39.4	.1258	39.4	.9192
24/15	38.8	.4358	39.9	1.48
25/16	38.8	.2081	39.9	1.626
26/17	39.4	.4203	39.5	.7071
27/18	S/D	S/D	S/D	S/D
28/19	S/D	S/D	S/D	S/D
29/20	S/D	S/D	S/D	S/D
30/21	S/D	S/D	S/D	S/D

* = 1ª Vacunación el día 1 y 2ª Vacunación el día 10 y en este mismo día se desafío con la "cepa" ALD,

** = Días postvacunación / y días postdesafío, S/D = Sin datos

FIGURA 8. GRUPO V.- TEMPERATURA RECTAL PROMEDIO DE LOS CERDOS QUE PREVIAMENTE RECIBIERON DOS APLICACIONES DE LA CEPA PAV-250 Y QUE FUERON DESAFIADOS CON LA CEPA PATÓGENA ALD-FPC



CUADRO 3. SIGNOS CLÍNICOS DE FPC EN LOS DIFERENTES GRUPOS.

SIGNOS	GRUPO I	GRUPO II		GRUPO III		GRUPO IV		GRUPO V	
	CONTROL/NO VAC Y NO EXP)	VAC ^{1D} PAV- 250	CENT	INOC AL D	CENT	VAC ^{2D} PAV-250 EXPALE	C E N T	VAC ^{2D} PAV-250 EXPALE	CENT
ANOREXIA	0/4	0/4	0/2	4/4	2/2	0/4	1/2	1/4	0/2
DEPRESIÓN	0/4	0/4	0/2	4/4	2/2	0/4	1/2	0/4	1/2
HIPIERTERMIA	0/4	1/4 * (1 DÍA)	0/2	4/4	2/2	2/4 (1 DÍA)	1/2 (2DÍAS)	1/4 (1DÍA)	1/2 (4DÍAS)
SECRETIÓN OCULAR	0/4	0/4	0/2	2/4	2/2	0/4	0/2	0/4	0/2
EMPEREMIA	0/4	0/4	0/2	2/4	2/2	0/4	0/2	0/4	0/2
AFILAMIENTO	0/4	0/4	0/2	4/4	2/2	0/4	0/2	0/4	0/2
VÓMITO	0/4	0/4	0/2	1/4	0/2	0/4	0/2	0/4	0/2
PERDIDA DE PESO	0/4	0/4	0/2	1/4	2/2	0/4	0/2	0/4	0/2
PASO TAMBALEANTE	0/4	0/4	0/2	0/4	2/2	0/4	0/2	0/4	0/2
PARÁLISIS	0/4	0/4	0/2	3/4	2/2	0/4	0/2	0/4	0/2
POSTRACIÓN	0/4	0/4	0/2	4/4	2/2	0/4	0/2	0/4	0/2
TEMBLOR MUSCULAR	0/4	0/4	0/2	4/4	2/2	0/4	0/2	0/4	0/2
HIPOTERMIA	0/4	0/4	0/2	1/4	0/2	0/4	1/2	0/4	0/2
MUERTE	0/4	0/4	0/2	3/4	0/2	0/4	1/2	0/4	0/2

* = Ligera hipertermia (< 40,4 °C); 1D = Una dosis; 2D = Dos dosis; VAC = Vacunados; INOC = Inoculados; EXP = Expuestos; CENT = Continuas.

CUADRO 9 - LESIONES OBSERVADAS A LA NECROPSIA EN LOS DIFERENTES GRUPOS.

LESIONES EN	GRUPO I	GRUPO II		GRUPO III		GRUPO IV		GRUPO V	
	CONTROL	VAC ^{1D} PAV/250	CENT	INOC	CENT	VAC ^{1D} PAV - 250 Y EXP ALD	CENT	VAC ^{2D} PAV - 250 Y EXP ALD	CENT
TONSILAS	0/4	0/4	0/2	3/4	1/2	0/4	1/2	0/4	0/2
GANGL. LINF (Edema, aumento de tamaño, hemorragias)	0/4	2/4*	1/2 *	4/4	2/2	0/4	2/2	2/4	1/2
RIÑÓN (Hemorragias)	0/4	0/4	0/2	4/4	2/2	0/4	1/2	0/4	1/2
VEJIGA URINARIA CON PETEQUIAS	0/4	1/4	1/2	3/4	2/2	1/4	2/2	3/4	2/2
BAZO (Infartos)	0/4	0/4	0/2	4/4	2/2	1/4	2/2	1/4	2/2
V. ILEOCECAL (Úlceras)	0/4	0/4	0/2	3/4	1/2	0/4	1/2	0/4	0/2
ENCÉFALO (Congestión meníngea)	0/4	0/4	0/2	3/4	0/2	0/4	1/2	0/4	0/2
TRACTORES* (Petequias, equimosis y hemorragias)	0/4	1/4	0/2	2/4	2/2	0/4	1/2	0/4	1/2
No TOTAL CON ALGUNA LESIÓN	0/4	3/4	2/2	4/4	2/2	2/4 **	2/2	0/4 **	2/2

* = Ligeramente inflamados. ** = ligeras lesiones. 1D = Una dosis, 2D = Dos acs.: VAC = Vacunados. CENT = Centurias. EXP = Expuestos, INOC = inculados

CUADRO 10. RESULTADOS OBSERVADOS DE LA NECROPSIA EN LOS DIFERENTES GRUPOS.

GRUPO Y NUMERO DE CERDO	LESIONES OBSERVADAS
GRUPO I	CONTROLES NO INOCULADOS
1	Lóbulo apical izquierdo con adherencias.
2	Pequeñas lesiones del tipo de la micoplasmosis, en el lóbulo cardíaco derecho
3	SCPA
4	SCPA
GRUPO II	VACUNADOS CON UNA DOSIS DE LA VACUNA PAV-250
5	Algunas petequias en la mucosa de la vejiga urinaria, hemorragias en la superficie del pulmón (probablemente a causa del shock).
6	Ganglio mandibular hemorrágico, pulmón SCPA, pequeñas petequias en la vejiga.
7	Ganglios periféricos hemorrágicos, pulmones SCPA.
8	SCPA
	CENTINELAS
9	Ganglio mandibular inflamado y congestionado, ligera congestión en la mucosa de la vejiga urinaria.
10	Pulmón SCPA, una petequia en la superficie del riñón izquierdo, ganglio mediastínicos inflamados.
GRUPO III	INOCULADOS CON LA "CEPA" PATÓGENA ALD
29	Tonsilas congestionadas, ganglios aumentados de tamaño y hemorrágicos, pulmón con lesiones en los lóbulos apical y cardíaco, vejiga con petequias en la mucosa, bazo con pequeños infartos, riñón con escasas petequias, encéfalo con congestión.
30	Tonsilas con congestión, válvula ileocecal con físcas, ganglios aumentados de tamaño, bazo con infartos, riñón con escasas petequias, vejiga urinaria con hemorragias en la mucosa.
31	Ganglios congestionados, congestión y petequias en la mucosa de la vejiga, pequeños infartos en el bazo, superficie de las tonsilas congestionadas. Petequias subcapsulares abundantes en riñón, válvula ileocecal con físcas, lesión en el lóbulo anteroventral diafragmático del pulmón derecho.
32	Ganglios aumentados de tamaño, lesiones en pulmón, bazo con infartos, riñón con petequias, vejiga urinaria con petequias en la mucosa.
	CENTINELAS

33	Infartos en el bazo, lesiones en el lóbulo anteroventral diafragmático del pulmón derecho, petequias abundantes en la vejiga.
34	Ganglio submandibular aumentados de volumen, orina de color normal, abundantes petequias en la mucosa de la vejiga, lesiones inespecíficas en los lóbulos diafragmáticos, pequeños infartos en el borde del bazo, 10 petequias en la superficie de cada riñón, úlceras en la válvula ileocecal.
GRUPO IV	VACUNADOS CON UNA DOSIS DE LA "CEPA" PAV-250 Y DESAFIADOS CON LA "CEPA" ALD-FPC
35	Sin datos
36	Bazo SCPA, orina normal, pulmones SCPA, escasas petequias en la mucosa de la vejiga, riñones SCPA.
37	Bazo con infartos en regresión, vejiga urinaria con escasas petequias y pequeñas hemorragias, pulmones SCPA.
38	Adherencias pleurales, dos petequias en la mucosa de la vejiga.
	CENTINELAS
39	Ganglios aumentados de tamaño y hemorrágicos, vejiga con hemorragias, bazo con pequeños infartos, riñón con escasas petequias.
40	Válvula ileocecal congestionada, infartos en el parénquima del bazo, pulmón SCPA, orina de color normal, escasas petequias en la mucosa de la vejiga, riñones con áreas de decoloración.
GRUPO V	VACUNADOS CON DOS DOSIS DE LA "CEPA" PAV-250 Y DESAFIADOS CON LA "CEPA" ALD-FPC
42	Congestión y petequias en la mucosa de la vejiga (mediana cantidad), ganglios mermoleados, lesiones en el lóbulo apical del pulmón derecho.
43	Ganglios submandibulares hemorrágicos, petequias escasas y pequeñas en la vejiga, ganglios mesentéricos hemorrágicos, pulmones SCPA.
44	Bazo infartado, pulmones SCPA, riñones sin petequias pero con la superficie decolorada, con algunas zonas que conservaron el color normal.
45	Pulmón con lesiones en el lóbulo apical derecho, cinco petequias en la mucosa de la vejiga, la serosa del bazo presentó un aspecto blanquecino, pequeñas suffusiones en la superficie del riñón, atribuibles al shock eléctrico y cinco petequias en la superficie.
	CENTINELAS
46	Escasas petequias en la mucosa de la vejiga, pequeños infartos en el parénquima del bazo y pulmón SCPA.
47	Aumento de volumen de los ganglios submandibulares, lesiones en el lóbulo diafragmático y apical del pulmón derecho, infartos subcapsulares en el bazo, orina de color ligeramente oscuro, escasas petequias subcapsulares en el riñón; petequias, congestión y hemorragias en la superficie de la vejiga.

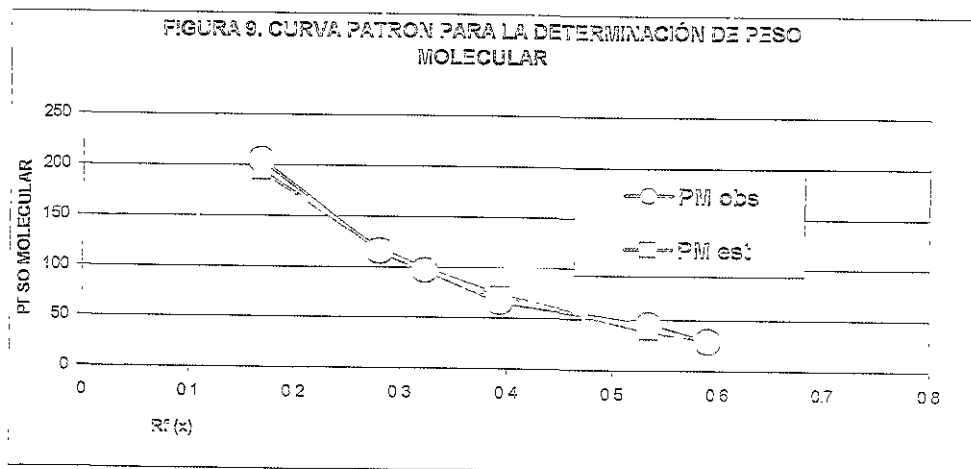
SCPA = Sin cambios patológicos aparentes.

IV y V, los anticuerpos se detectaron a partir del día 15 postvacunación, observándose negativos los cerdos centinelas de ambos grupos. En los Cuadros 13 al 17 se pueden observar los resultados obtenidos.

4.5 Comparación del patrón electroforético de las proteínas de las cepas en estudio. - En las Figuras 10 y 11 se muestra un gel con los corrimientos obtenidos a partir de las cepas y de las muestras de medio de cultivo, células PK-15 y SFB, en el cual se pueden apreciar sus fracciones o bandas correspondientes. Los geles (preparados con 12.5 % de acrilamida bis-acrilamida), fueron teñidos con Nitrato de Plata, con lo cual se marcaron las bandas bien definidas.

La Figura 9 muestra la curva de calibración estándar de los marcadores de PM's, resultando en una ecuación de regresión de $\text{Log PM} = 2.6087$ con una correlación (r) de 0.9928. Posteriormente se obtuvieron los valores de los Rf's (movilidad relativa) de cada banda y se obtuvieron todos los PM's. En el Cuadro 11 se observan los pesos moleculares de las cepas estudiadas del VFPC y de las tres muestras trabajadas paralelamente (células, medio de cultivo y suero fetal bovino), que fueron obtenidos mediante las pruebas de electroforesis; también se muestran las proteínas correspondientes a cada muestra trabajada. Estas proteínas fueron, medio de cultivo, dos bandas con PM de 111 a 92 kd; para el SFB, 16 bandas, de 264 a 6 kd, para el virus patógeno ALD- FPC, 20 bandas con PM de 337 a 5 kd, para las células PK-15, 38 bandas con PM de 382 a 6 kd; y para la cepa vacunal PAV-250, 22 bandas con PM de 337 a 5 kd. De todas las proteínas detectadas en ambas cepas de FPC las siguientes se encuentran mencionadas en la literatura en el caso de la cepa ALD las de 206, 161, 151, 111, 98, 68, 60, 50, 44, 36, 30, 22, 17 y 7 kd; para la cepa PAV-250, son las de 118, 111, 87, 77, 68, 64, 56, 47, 34, 30, 27, 23, 19, 13 y 7 kd.

En el Cuadro 12, se mencionan las proteínas que han sido informadas en la literatura con anterioridad, y la bibliografía que las respalda.



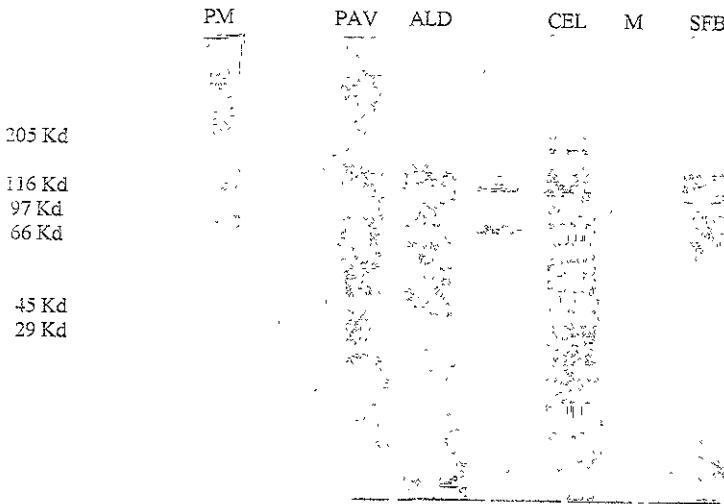
CUADRO 11. PROTEINAS DETECTADAS A PARTIR DE LAS CEPAS ALL Y PAV-250 DEL VFP, Y DEL MEDIO DE C.C., SUERO-FE Y CELS. PK-15, MEDIANTE LA PRUEBA DE ELECTROFORESIS, TEÑIDAS CON NITRATO DE PLATA.

MEDIO-C.C.	SUERO-FE	"CEPA" ALL	CELS. PK-15	VAC-PAV-250
		219 a, b		219 b
		206 a, b *		
			171	
	161	161 a, b	161	
		151 a, b	151	
			142	
			126	
	118			118 a, b
111		111 a, b	111	111 a, b
	104		104	
		98 a, b, *		
92	92		92	
				87 a, b, *
			82	
				77 a, b, *
	72		72	
		68 a, b	68	68 a, b
				64 a, b, *
	60	60 a	60	
	56		56	56 b
		50 a, b	50	
			47	47 a, b
		44 b	44	
				41 a, *
			39	
		35 a, b, *		
	34		34	34 a, b
			32	
		30 a, b		30 a, b
			28	
			27	27 a, b
				23 a, b, *
		22 a, b	22	
	19		19	19 b
	18		18	
		17 a, b	17	
			14	
	13		13	13 b
			12	12 a
			10	10
			9	

	8	8		8
	7	7b	7	
	6	6a	6	
		5a		5

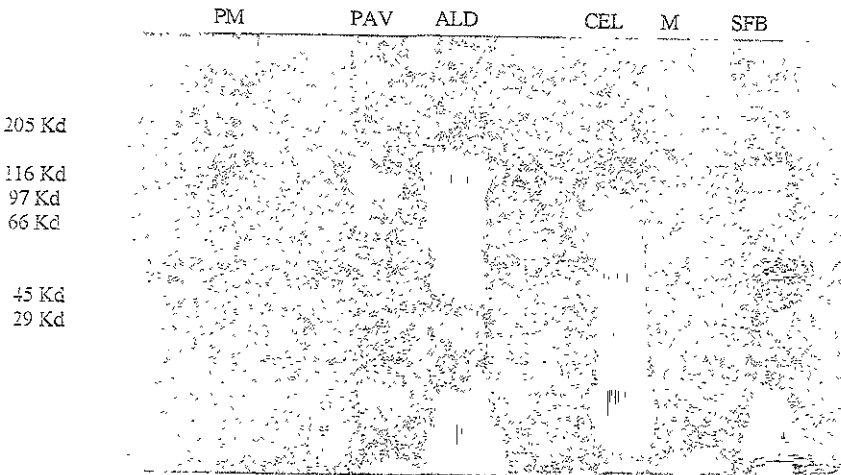
a = Proteínas diferentes entre las dos cepas de TPC estudiadas en el presente trabajo; a = Proteínas reconocidas en el presente trabajo por los sueros inmunes, en las pruebas de inmunotransferencia; b = Proteínas reconocidas en la literatura consultada; SUERO-TB = Suero Fetal Bovino.

FIGURA 10.- ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRIDAMIDA CON LAS "CEPAS" PAV.250 Y ALD DE FPC; CON TINCION DE NITRATO DE PLATA.



PAV=CEPA VACUNAL -250; ALD=CEPA PATOGENA; CEL=CELULAS PK-15 NO INOCULADAS; M=MEDIO DE CULTIVO; SFB=SUERO FETAL BOVINO

FIGURA 11.- ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRIDAMIDA CON LAS "CEPAS" PAV.250 Y ALD DE FPC; CON TINCION DE NITRATO DE PLATA.



PAV=CEPA VACUNAL -250; ALD=CEPA PATOGENA. CEL=CELULAS PK-15 NO INOCULADAS; M=MEDIO DE CULTIVO. SFB=SUERO FETAL BOVINO

4.6 Pruebas de inmunotransferencia - Con respecto a los sueros inmunes de los cinco grupos de cerdos trabajados por la prueba de inmunotransferencia, en las Figuras de la uno a la 10, se observan las tiras de papel de nitrocelulosa, en las que se realizó la técnica de inmunotransferencia, transfiriendo las proteínas de las cepas ALD y PAV-250 del VFPC, y haciéndolas reaccionar con los sueros obtenidos en los siete diferentes muestreos de los grupos de cerdos correspondientes, que fueron trabajados; y el suero de cada cerdo fue puesto en contacto con una tira de papel de nitrocelulosa que contenía las proteínas transferidas de la cepa ALD y con otra tira de papel similar, que contenía las proteínas de la cepa PAV-250; en los Cuadros del 13 al 22, se observa el PM de cada banda de proteínas reconocidas, de cada grupo trabajado.

De la información mostrada en los Cuadros 13 al 17 (Figuras 12 a la 16), podemos observar que para la cepa PAV-250 hubo reconocimiento de las siguientes proteínas:

Grupo I.- Control negativo: en el primer muestreo seriológico hubo reconocimiento de cuatro bandas de 139 a 89 kd, el día uno; dos bandas de 130 a 24 y de 118 kd, el día cinco; dos bandas de 141 a 125 kd, el día 10; cuatro bandas de 139 a 105 kd, el día 15; cuatro bandas de 125 a 92 kd, el día 20; cuatro bandas de 131 a 83 kd, el día 25; y dos bandas de 81 a 42 kd, el día 30.

Grupo II.- Vacunados con una dosis de la cepa PAV-250: hubo una banda de 89 kd (en los cerdos vacunados), el día uno; dos bandas de 130 a 118 y de 112 kd (en los vacunados), el día cinco; dos bandas de 118 a 104 kd (vacunados), y una de 118 kd (en los centinelas), el día 10; tres bandas de 293 a 87 kd (vacunados) y dos bandas de 116 a 96 y de 87 kd (centinelas), el día 15; cinco bandas de 135 a 85 kd (vacunados) y una de 107 kd (centinelas), el día 20; tres bandas de 121 y de 89 a 83 kd (vacunados) y dos de 89 y 83 kd (centinelas), el día 25; dos bandas de 81 y 23 kd (vacunados) y dos bandas de 81 y 27 kd (centinelas), el día 30.

Grupo III.- Sueros de los cerdos inoculados con la cepa patógena ALD de FPC: se detectó una banda de 89 kd (vacunados), el día uno; una banda de 118 kd (centinelas), el día cinco; una banda de 118 kd (vacunados), el día 10; cuatro bandas de 116 a 80 y de 66 kd (inoculados) y cuatro bandas de 168 a 66 kd (centinelas), el día 15; tres bandas de 115 a 92 kd (inoculados) y dos bandas de 107 a 92 kd (centinelas), el día 20; una banda de 83 kd (inoculados) y dos bandas de 97 y 83 kd (centinelas), el día 25; dos bandas de 27 y 23 kd (centinelas), el día 30.

Grupo IV.- Sueros de los cerdos vacunados con una dosis de la cepa PAV-250 y desafiados con la cepa ALD de FPC: una banda de 89 kd (vacunados), el día uno; dos bandas: una de 130 a 48 (vacunados) y otra de 112 a 101 kd (vacunados), el día cinco; una banda de 104 kd (vacunados) y una banda de 118 kd (centinelas), el día 10; cinco bandas de 222 a 72 kd (vacunados) y dos bandas de 116 a 87 y de 105 a 80 kd (centinelas), el día 15; tres bandas de 169 a 92 kd (vacunados) y dos bandas de 115 a 92 kd (centinelas), el día 20; dos bandas de 97 y 83 kd (vacunados) y tres bandas de 112 a 97 y de 81 kd (centinelas), en el día 25; una banda de 81 kd (vacunados) y dos bandas de 96 y 81 kd (centinelas), el día 30.

Grupo V.- Sueros de cerdos vacunados con dos dosis de la cepa PAV-250 y desafiados con la cepa patógena ALD de FPC: dos bandas de 137 y de 124 a 118 kd (vacunados), el día cinco; dos bandas de 118 y 111 kd (vacunados) y una banda de 118 kd

(centineelas), el día 10, cuatro bandas de 127 a 31 kd (vacunados), y una de 105 kd (centineelas), el día 15, cuatro bandas de 115 a 92 kd (vacunados), y dos de 107 y 92 kd (centineelas), el día 20, dos bandas de 89 a 83 y de 89 kd (vacunados), y una de 83 kd (centineelas), el día 25, tres bandas de 134 a 81 kd (vacunados) y tres bandas de 134 a 27 kd (centineelas), el día 30

En los Cuadros 18 a 22 (Figuras 12 a la 16) se observa con respecto a la cepa ALD, que se reconocieron las proteínas siguientes

En el Grupo I: en el primer muestreo hubo dos bandas, una de 195 y otra de 200 a 100 kd, el día uno, siete bandas de 159 y de 71 a 59 kd, el día cinco, cuatro bandas de 113 a 75 y de 30 a 23 kd, el día 10, nueve bandas de 244 a 17 kd, el día 15; 20 bandas de 290 a 11 kd, el día 20, dos bandas de 100 a 59 y de 92 a 59 kd, el día 25; y bandas de 137 a 117 y de 29 a 23 kd, el día 30

Grupo II, dos bandas de 144 a 79 y de 55 kd (vacunados) y una de 120 a 100 kd (centineelas), el día uno; 11 bandas de 287 a 14 kd (vacunados) y cuatro bandas de 150 a 65 kd (centineelas), el día cinco; siete bandas de 145 a 27 kd (vacunados) y tres de 96 a 58 y de 30 a 23 kd (centineelas), el día 10, tres bandas de 91 a 50 y de 20 kd (vacunados) y cinco bandas de 91 a 50 y de 18 kd (centineelas), el día 15; 22 bandas de 290 a 6 kd (vacunados) y seis bandas de 290 y de 11 kd (centineelas), el día 20; 10 bandas de 238 y 23 a 17 kd (vacunados) y dos bandas de 100 a 59 y de 92 a 59 kd (centineelas), el día 25; ocho bandas de 223 a 27 kd (vacunados) y siete bandas de 206 y de 38 a 27 kd (centineelas), el día 30.

Grupo III : dos bandas de 144 a 79 y de 55 kd (vacunados) y una de 144 a 89 kd (centineelas), el día uno; cuatro bandas de 287 y de 103 a 59 kd (vacunados) y tres bandas de 94 a 23 kd (centineelas), el día cinco; cinco bandas de 282 y de 69 a 54 kd (vacunados) y tres bandas de 104 a 75 y de 75 a 63 kd (centineelas), el día 10; ocho bandas de 50 a 75 y de 41 kd (vacunados) y siete bandas de 91 a 75 y de 18 kd (centineelas), el día 15, 22 bandas de 290 a 6 kd (vacunados) y 13 bandas de 290 y de 15 a 10 kd (centineelas), el día 20; dos bandas de 100 a 59 y de 65 kd (vacunados) y cuatro de 100 a 84 kd y de 59 kd (centineelas), el día 25; ocho bandas de 284 y de 27 a 23 kd (centineelas), el día 30.

Grupo IV; dos bandas de 208 y de 153 a 79 kd (vacunados) y dos bandas de 144 a 79 y de 62 a 55 kd (centineelas), el día uno; siete bandas de 287 y de 28 a 21 kd (vacunados) y dos bandas de 150 y de 103 a 59 kd (centineelas), el día cinco; cuatro bandas de 259 a 63 kd (vacunados) y una de 96 a 58 kd (centineelas), el día 10; seis bandas de 91 a 61 y de 18 kd (vacunados) y dos de 91 a 50 kd y de 61 a 50 (centineelas), el día 15; 21 bandas de 290 a 5 kd (vacunados) y 10 bandas de 290 y de 16 a 11 kd (centineelas), el día 20; 10 bandas de 238 a 50 kd (vacunados) y una banda de 92 a 54 kd (centineelas), el día 25, 18 bandas de 284 a 23 kd (vacunados) y nueve bandas de 284 y de 27 a 23 kd (centineelas), el día 30.

Grupo V; una banda de 144 a 89 kd (vacunados) y una de 144 a 89 kd (centineelas), el día uno; tres bandas de 150 y de 103 a 65 kd (vacunados) y dos bandas de 103 a 59 y de 94 a 65 kd (centineelas), el día cinco, cuatro bandas de 172 y de 30 a 25 kd (vacunados) y una de 145 a 63 kd (centineelas), el día 10, siete bandas de 91 a 50 y de

18 kd (vacunados), y una banda de 91-50 kd (centinelas), el día 15; 16 bandas de 290 y de 15 a 11 kd (vacunados) y 11 bandas de 157 y de 15 a 10 kd (centinelas), el día 20; ocho bandas de 238 a 46 kd (vacunados) y una de 92 a 59 kd (centinelas), el día 25; 16 bandas de 284 y de 29 a 23 kd (vacunados) y 10 bandas de 284 y de 29 a 23 kd (centinelas), el día 30.

DISCUSIÓN

Actualmente se están empleando las técnicas de la biología molecular en la tecnología para el diagnóstico, prevención y erradicación de varias enfermedades de los cerdos. Uno de los ejemplos más sobresalientes es la utilización de la vacuna con "deleción" de la glicoproteína (gp) G1 para la prevención de la Pseudorrabia; con la cual es posible diferenciar mediante pruebas serológicas de ELISA, a los cerdos vacunados de los cerdos infectados con virus de campo (lo que permite que sean identificados, diferenciados y sacrificados). Y siguiendo esta metodología se han conducido programas exitosos de erradicación de la Pseudorrabia en las poblaciones de varios países de Europa (Westergaard, 1996).

En el caso del VFPC, de acuerdo a lo mencionado por Moennig (1988), no se han encontrado diferencias antigénicas importantes entre los diferentes aislados. Sin embargo, a partir de las primeras investigaciones que hubo al respecto, quedó claro que sí se han detectado variantes, que difieren de las cepas "standard" en cuanto a su estructura antigénica y también en cuanto a su patogenicidad. Estas cepas variantes fueron observadas después de las inmunizaciones masivas de piaras porcinas, al emplear el método de la serovacunación. Si resultaron de una variabilidad natural del VFPC o si emergieron bajo la presión selectiva de la serovacunación, fue algo que estuvo sujeto a discusión. Se observó que la neutralización con el antisero homólogo era más eficiente que la neutralización por el suero heterólogo. También se obtuvieron resultados similares con IFD. De esta manera se distinguieron dos grupos de cepas de FPC que varían con respecto a su patogenicidad y comportamiento serológico; el primer grupo de virus que comprendía a la cepa Alfort, Thiverval y la cepa China; y el segundo grupo de VFPC, representado por la cepa 331, que mostró una relación serológica más cercana con el VBVD. Además se describieron cepas del VFPC que correspondieron a tipos intermedios; por otra parte, independientemente de las relativamente pequeñas variaciones antigénicas que existen entre los VFPC se han establecido cierto número de cepas.

De acuerdo a Van Oirschot (1999), si se tiene una marcada variación antigénica entre las cepas del VFPC, ésta probablemente reside sobre la unidad antigénica no conservada que está a la mitad de la terminal-N de la proteína E2 y también en la proteína E1.

Actualmente ya existe una vacuna recombinante (Labs. Intervet México) para la prevención de la FPC, sin embargo, se ha visto que es poco inmunogénica, al grado de que se requieren dos aplicaciones para dar protección. También existe una vacuna subunitaria E2, de los Labs. Bayer, la cual también requiere de dos aplicaciones (Méndez, 1999). Y no obstante que ya existen estas dos vacunas y que cada una cuenta con su "kit" de ELISA diferencial, se considera que se deben continuar realizando estudios tendientes a lograr la misma meta, pero utilizando la misma cepa vacunal PAV-250. Dado que esta última cepa vacunal ofrece condiciones superiores de potencia, aparte de que no se disemina de los cerdos vacunados a los susceptibles puestos en contacto (Correa, 1998), y a que es la que actualmente se está utilizando en México, en los programas de vacunación de la Campaña contra la FPC, de la Dirección General de Salud Animal (D.G.S.A.). Por esta razón se decidió estudiar las proteínas de la cepa vacunal PAV-250, comparándola con una cepa virulenta de referencia (ALD) de FPC, para tratar de investigar si existen o no diferencias entre las proteínas de ambas cepas, que sirvieran de fundamento para seguir adelante con esta línea de investigación, y tratar de diferenciar a los cerdos vacunados, de los infectados

Ante la infección por el VFPC se pueden manifestar diferentes formas de la enfermedad, en las que se pueden observar distintos periodos de incubación, e incluso el curso de la enfermedad también es variable. En cuanto a estos dos últimos aspectos de la enfermedad, es determinante el tipo de cepa del VFPC que esté presente, como consecuencia, se alcanzarán a formar los anticuerpos séricos específicos, antes de que muera el animal afectado, dependiendo de la duración del periodo de incubación, y del tiempo que se prolongue el curso de la enfermedad. Así, las cepas virulentas del VFPC (virus de campo) y de referencía, que causan la forma aguda de la enfermedad, se caracterizan por periodos de incubación y cursos muy cortos, de modo que a los animales no les da tiempo de desarrollar títulos detectables de anticuerpos séricos, en el caso de las cepas de baja virulencia, se presentarán periodos de incubación y cursos largos, por lo cual los cerdos afectados alcanzarán a formar sus anticuerpos séricos específicos (Van Oirschot, 1992 y 1999), por otra parte, las cepas vacunales de la FPC, por ser inocuas, estimulan también anticuerpos séricos específicos, prácticamente sin que se presenten signos clínicos (Correa, 1998).

Por lo anterior es difícil lograr la producción experimental de anticuerpos contra las cepas virulentas del FPC, porque generalmente los cerdos mueren antes de desarrollar los anticuerpos; y por esta razón fue necesario emplear un procedimiento que permitiera poder obtener dosis mínimas infectantes de la cepa virulenta ALD, que al ser aplicada produjera la infección pero que ésta no fuera letal, por lo menos para algunos de los cerdos inoculados, y que a esas dosis mínimas ocasionará un periodo de incubación y un curso de la enfermedad, lo suficientemente largo para que se alcanzaran a formar los anticuerpos, de modo que se pudiera contar con los sueros inmunes para realizar las pruebas serológicas planeadas.

Por lo tanto, mediante el estudio inicial, realizado en cerdos susceptibles, se logró infectar a los cerdos con cantidades de virus muy bajas, lo cual permitió el que se pudiera utilizar dicha dosis en forma exitosa en el experimento subsecuente. Ya que de acuerdo a los resultados obtenidos en el experimento inicial, se logró que los 2 cerdos sobrevivieran durante 30 y 38 días postinoculación, respectivamente, manifestando los signos característicos de la enfermedad, pero con un curso largo (Cuadro 2, Figura 3), lo cual fue semejante a haber logrado producir una enfermedad crónica, de acuerdo a lo reportado en la literatura (Van Oirschot, 1988; Terpstra, 1991; Sierra *et al.*, 1994). Al aplicar la misma dosis, en los cerdos del experimento subsecuente, fue posible que transcurriera el tiempo suficiente para la producción de anticuerpos. De modo que la dilución utilizada de 10^{-6} /ml, del virus ALD, fue la adecuada para lograr obtener el suero inmune contra la cepa patógena ALD-FPC. Lo cual era indispensable para utilizarlo posteriormente en las IT, para comparar los resultados, con los obtenidos con el suero producido contra la vacuna PAV-250.

Con respecto a la inoculación con diferentes dosis, los datos concuerdan con lo reportado por Van Oirschot (1988), y Dahle y Liess (1992), los cuales mencionan que dependiendo de la dosis de virus usada para inocular a los cerdos, será la duración del curso de la infección; por otro lado, Van Oirschot (1988) también menciona, que en el caso de una infección producida con un VFPC de baja virulencia, la replicación viral avanza más lentamente y entonces habrá tiempo suficiente para que la respuesta inmune pueda desarrollarse, mediante lo cual se podrá prevenir la amplia difusión viral en el cuerpo del cerdo afectado, así mismo, Dahle y Liess (1992), señalan que al hacer una titulación viral,

inoculando lechones destetados con la cepa virulenta Aifort, observaron que la dosis mínima infectante capaz de producir una enfermedad fatal, correspondió a menos de 10 dosis infectantes 50% para cultivos celulares (DICC_{50%}) por cerdo. Y que con la más alta dilución viral, con la cual se logró producir la enfermedad, sólo uno de los 4 animales inoculados murió, mientras que los tres cerdos sobrevivientes desarrollaron anticuerpos neutralizantes. Lo anterior coincidió con lo que se observó en el presente trabajo, ya que en los cerdos inoculados se pudieron producir infecciones crónicas, cuando se les aplicó una cantidad mínima del virus virulento.

Con base en la mencionada experiencia preliminar, en el experimento subsecuente, el título del virus patógeno ALD utilizado sin diluir fue de $10^{4.99}$ DICC/ml, determinado por la prueba de IP, aplicada a los cultivos celulares inoculados. A partir de este título original, se hicieron 4 diluciones décuples, y de la última dilución se le inoculó 1 ml a cada cerdo de los grupos III, IV y V. Lo anterior explica el porqué se logró infectar a los mencionados cerdos con una dosis aproximadamente 10 veces más diluida; y está de acuerdo con Carbrey (1988), quien menciona que el cerdo es hasta 10 veces más sensible que los cultivos celulares, para detectar el VFPC. Lo cual coincide también con lo observado en este trabajo, ya que los cerdos inoculados del Grupo III, mostraron signos y lesiones de FPC (Cuadro 8 y 9; Figura 6), antígeno en las tonsilas, y uno desarrolló anticuerpos contra la FPC, detectados por IP; mientras que los cerdos de los grupos IV y V desarrollaron anticuerpos contra la FPC, y mediante las pruebas de IT, se demostró que detectaron algunas proteínas pertenecientes a la cepa ALD, además de haber detectado proteínas de la cepa PAV-250, dado que esos dos grupos fueron vacunados.

Los controles negativos del Grupo I, permanecieron normales, sin mostrar signos clínicos, ni lesiones a la necropsia (Cuadros 8 al 10; Figura 4); sus tonsilas fueron negativas a la prueba de IFD y no se les detectaron anticuerpos VN-IP. Sin embargo, al realizar las pruebas de inmunotransferencia (IT) el suero de uno de ellos reaccionó ante el antígeno de FPC en el muestreo correspondiente al día 20 del experimento. Dado que las tonsilas fueron negativas a la IFD, esto último pudo haberse debido: por un lado a una contaminación por el VFPC patógeno, procedente de los grupos inoculados (no obstante que los controles estaban en una construcción localizada aparte), lo cual parece ser poco factible ya que no hubo signos de la enfermedad; o por el otro a una posible interferencia con otro pestivirus; lo cual por haber ocurrido en los últimos días del experimento y en un solo cerdo, no afectó notablemente el desarrollo, ni la interpretación de los resultados.

El Grupo II, vacunado con una dosis de PAV-250, se comportó clínicamente normal, en la forma esperada, al igual que los centinelas; y al hacer la necropsia sus tejidos estaban aparentemente normales, excepto que en varios de ellos se encontró que los ganglios estaban ligeramente hemorrágicos; lo cual muy probablemente se debió a factores inespecíficos, ya que las tonsilas fueron negativas a la prueba de IFD (Cuadros 8 al 10; Figura 5). El no haber encontrado el antígeno de FPC en las tonsilas de este grupo, comprueba que el antígeno de la cepa vacunal PAV-250 no es detectado a los 30 días postvacunación; y esta de acuerdo a lo observado en trabajos previos, donde en pruebas preliminares se ha observado que en los cerdos vacunados con la vacuna PAV-250 y sacrificados a diferentes períodos, el antígeno se detectó en varios tejidos al día 5 y 7 postvacunación; mientras que los días 10 y 40, el antígeno no estuvo presente (Coba y

Correa, 1995, no publicado) En este trabajo se observó que los anticuerpos VN-IP contra la PAV-250 se detectaron a los 15 días postvacunación, mientras que los cerdos centinelas permanecieron negativos durante 30 días, con lo cual se comprobó una vez más que la cepa PAV-250 no se disemina de los cerdos vacunados a los cerdos susceptibles puestos en contacto (Correa *et al*, 1995) Otros investigadores también han observado que los anticuerpos VN-FPC se pueden detectar a partir de los 15 días, o entre las 2 y 3 semanas después de que los animales están en contacto con el VFPC (Ehrensperger, 1988 y Van Oirschot, 1988 y 1992).

El grupo III (inoculado con ALD) se observó que todos los cerdos mostraron signos y lesiones de FPC, incluyendo a sus correspondientes cerdos centinelas, y sólo logró sobrevivir uno de los inoculados durante los 30 días del experimento (Cuadro 5 y 8 al 10; Figura 6) Lo anterior concuerda con lo descrito por Sierra *et al* (1994) y por Dahle y Liess (1992), quienes mencionan que hay marcadas diferencias de susceptibilidad individual de los cerdos ante diferentes cepas de FPC. Sus tonsilas fueron positivas a la prueba de IFD. Uno de los 4 cerdos inoculados de este grupo desarrolló anticuerpos VN contra el VFPC, los cuales fueron detectados a partir de los 15 días después de la inoculación (día 25 del experimento), con títulos de $\geq 1:10$, determinados por la técnica de IP; estos anticuerpos continuaron siendo detectados hasta el día 30 en que se finalizó el experimento, cuando este cerdo fue sacrificado, estos datos fueron similares a los encontrados por Ehrensperger (1988) y Van Oirschot (1988, 1992, 1999) En los demás cerdos de este Grupo III (3 cerdos inoculados y 2 centinelas) no se detectaron anticuerpos VN-IP, a la dilución trabajada (1:10), dado que uno de ellos murió el día 10; y no obstante que los otros dos murieron el día 16 postinoculación; pudo haber sucedido que estos últimos tuvieran títulos de anticuerpos VN $\leq 1:10$ ante la prueba de IP, y que por ser tan bajos los títulos no hubieran sido detectados por esta prueba. Esto último es posible, ya que de hecho con estos sueros se observó reconocimiento de las bandas de proteínas correspondientes al antígeno de FPC (cepa ALD), al utilizarlos en la prueba de inmunotransferencia (muestreo del día 20, o sea día 10 después de la inoculación con ALD); lo cual indica que hubo estimulación de la formación de anticuerpos, y corrobora que la prueba de inmunotransferencia es mucho más sensible que la VN-IP, tal como lo menciona Sandvik, (1997).

Con respecto a los cerdos centinelas del Grupo III (inoculados con ALD), éstos presentaron signos a partir de los días 13 y 14 postinoculación, y posteriormente lesiones de FPC (Cuadros 5 y 8 al 10; Figura 6). Se sacrificaron a los 30 días del experimento y se confirmó la presencia del antígeno en los cortes hechos a partir de sus tonsilas, por la técnica de IFD; y sin embargo, no se pudieron detectar anticuerpos VN-IP. Esto probablemente fue debido a que fueron sacrificados antes de tener el tiempo suficiente para poder desarrollar títulos detectables de dichos anticuerpos; ya que sólo pasaron aproximadamente 7 u 8 días, desde que sus compañeros, previamente inoculados por la vía IM, teóricamente empezaron a diseminar VFPC en el medio ambiente. O sea que es probable que el virus haya infectado a los cerdos centinelas y que sólo permaneciera en su organismo por aproximadamente 7-8 días, hasta el momento del sacrificio y por ello se detectó el antígeno viral en sus tejidos; este cálculo es aproximado, y fue hecho con base en la elevación de la temperatura rectal y la fecha de la aparición de los signos clínicos, en los diferentes cerdos de este grupo (Cuadros 5 y 8); tomando en cuenta el período de incubación y el tiempo que tardan en ser detectados los anticuerpos VN (Ehrensperger, 1988, Terpsira, 1991 y Van Oirschot, 1988, 1992, 1999); lo cual respalda las razones por las que sí se

detectó el antígeno-FPC, pero no se demostró la presencia de anticuerpos VN-IP contra el VFPC.

Por otra parte Terpstra (1991) y Van Cirschof (1992, 1999), también mencionan que las cepas patógenas sí se excretan (o diseminan) del cerdo afectado, pudiendo infectar a los cerdos susceptibles que estén en contacto; de lo cual se deduce que los cerdos centinelas del Grupo III, se infectaron con el virus excretado por los cerdos inoculados.

En el Grupo IV, los cerdos vacunados con una dosis de PAV-250 e inoculados con la cepa virulenta ALD, en general no presentaron signos ni lesiones; excepto por una muy ligera elevación de la temperatura (en dos) durante un solo día; y hubo escasas lesiones a la necropsia en uno. En un cerdo centinela también hubo ligera hipertermia durante dos días y murió presentando signos y lesiones de FPC; el otro centinela no mostró signos, pero a la necropsia mostró lesiones (Cuadros 6 y 8 al 10; Figura 7). Los anticuerpos VN-IP en todos los vacunados fueron detectados a partir del día 15 y permanecieron hasta el día 30, cuando fueron sacrificados; mientras que los centinelas probablemente no alcanzaron a desarrollar anticuerpos detectables por la prueba de VN-IP. Las tonsilas fueron positivas en los cerdos vacunados e inoculados, mientras que fueron negativas las del cerdo centinela, no obstante que presentó signos y lesiones de FPC.

En el Grupo V, integrado por los cerdos que fueron vacunados con dos dosis de la vacuna PAV-250 e inoculados con la cepa patógena ALD, sólo en uno hubo una muy ligera hipertermia durante un día y ninguno murió; y a la necropsia se observaron escasas lesiones sospechosas de FPC. Uno de los centinelas mostró signos; pero ninguno de los dos centinelas murieron, presentando ambos escasas lesiones en varios tejidos (Cuadros 7 al 10; Figura 8); mientras que fueron positivas las tonsilas de los cerdos tratados, y las de un centinela. En este grupo los anticuerpos (VN-IP) fueron detectados a los 15 y 20 días después de la primera vacunación.

De lo anterior se puede interpretar que la vacuna PAV-250 protegió ante la inoculación con la cepa virulenta ALD en los grupos IV y V (Cuadro 8). Y que este virus patógeno ocasionó que uno de los centinelas del Grupo IV muriera con signos de FPC (Cuadro 8) y que los otros 3 centinelas presentaran escasas lesiones (Cuadro 10). Por lo cual se puede interpretar que la vacunación con la cepa PAV-250 redujo en gran medida el que el virus virulento se diseminara de los vacunados a los centinelas puestos en contacto. También se podría interpretar que dado que los cerdos controles inoculados con ALD, estaban dentro de la misma instalación, el virus patógeno pudo haber circulado de éstos hacia los centinelas de los Grupos IV y V, a través de fomites, o por aerosoles contaminados, no obstante que se tomaron precauciones para que no sucediera esto último. Aunque también pudo haberse tratado de una infección causada por otro Pestivirus. Sin embargo, a pesar de que no se detectaron anticuerpos VN-IP con los sueros de los centinelas de los Grupos II, III, IV y V, si se detectaron bandas de proteína del VFPC, mediante las pruebas de IT (Cuadros 13 al 22, Figuras 13 a la 16); lo cual significa que los cerdos sí tenían títulos bajos de anticuerpos, los cuales no fueron detectados por la prueba de VN-IP a la dilución de 1:10. Y dado que se detectaron dos proteínas con PwI de 85 y 78 kD, que sólo pertenecen a la cepa ALD (Mendoza, 1995), se puede concluir que esta cepa fue la que estuvo circulando e infectando a los cerdos centinelas.

A partir de estas observaciones y con base en los estudios previos realizados con la cepa vacunal PAV-250, en los cuales se observó que en condiciones de campo, en presencia de un brote activo de FPC, al vacunar con doble dosis, se redujo la mortalidad al 0%, y que al vacunar con una dosis, se observó solo 10% de mortalidad, mientras que en los controles hubo 40% de mortalidad por FPC (Correa *et al*, 1995 y Correa, 1998). Lo mencionado anteriormente, concuerda con los datos descritos en un trabajo reciente, elaborado por González (2000); en el que se estudió el efecto de la vacunación con la cepa PAV-250, sobre la transmisión por la vía respiratoria del VFPC mediante aire contaminado con aerosoles procedentes de animales inoculados, el cual se menciona que la vacunación con la cepa PAV-250, impidió la transmisión del virus de exposición ALD, por la vía aérea. Datos similares fueron encontrados por Van Girschoot (1992), quien menciona que vacunando con la cepa China se evita la transmisión del virus virulento hacia los cerdos susceptibles puestos en contacto.

Con base en lo anterior se lograron obtener los sueros inmunes de los Grupos II, III, IV y V, indispensables para realizar las últimas etapas de este estudio

En cuanto al número y PM de las proteínas detectadas a partir del VFPC, al revisar la literatura se pudo observar que los estudios realizados hasta el momento, han mostrado divergencias (Zamora *et al*, 1994). Sin embargo diferentes autores coinciden en que básicamente las proteínas estructurales del VFPC son : La p14 de la nucleocápside y 3 glicoproteínas, llamadas proteínas E, las cuales son la E0-gp44/48, la E1-gp33 y la E2-gp55.

Por otra parte las proteínas no estructurales son : p120 (p54 y p80), p10, p30, p133 (p58, p75) y la p23 (Zamora *et al*, 1994; Bommeli, 1997) y de acuerdo con Kassimi *et al* (1996), también se incluyen las proteínas de 76, 107 y 145 kD. Las proteínas estructurales, antes descritas y especialmente las glicoproteínas, se encuentran sobre la superficie externa del virus y/o en las células infectadas, y juegan un papel importante en el curso de la infección del virus de acuerdo a lo descrito por Zamora *et al* (1994) y Bommeli (1997).

Bajo las condiciones en que se desarrolló el presente trabajo, mediante las pruebas de electroforesis, se detectaron varias proteínas descritas en la literatura, presentes también en las cepas PAV-250 y ALD del VFPC (Cuadro 12). Las proteínas descritas corresponden a proteínas estructurales de la envoltura E2-gp55, E0-gp44/48, y de la nucleocápside; así como proteínas no estructurales.

Con relación a la cepa vacunal PAV-250, de acuerdo con la literatura consultada, las proteínas estructurales fueron las de PM de: 68, 54, 56, 47, 41, 34, 19 y 13 kD (Enzmann & Weiland, 1978; Doris *et al*, 1980, 1984; Wensvoort *et al*, 1990; Wilke *et al*, 1990; Rumenapf *et al*, 1991; Taiel *et al*, 1991; Jeinz *et al*, 1991-1992; Muyldermans *et al*, 1993; Hulst *et al*, 1993; Stark *et al*, 1993 y Kassimi *et al*, 1996); y las proteínas no estructurales fueron las de 77, 30, 27 y 23 kD (Enzmann & Weiland, 1978; Wensvoort *et al*, 1990; Muyldermans *et al*, 1993; Stark *et al*, 1993; Mendoza, 1995 y Kassimi *et al*, 1996). Asimismo las proteínas con PM de 219, 111, 87, 64, 56, 27 y 23 kD correspondientes a la cepa vacunal PAV-250, reportadas por Mendoza (1995), también fueron detectadas en este estudio

Con la cepa patógena ALD las proteínas estructurales fueron las de 68, 50, 44, 36 y 17 kD (Mathews, 1979; Emile *et al*, 1990; Wensvoort *et al*, 1990; Heinz *et al*, 1991-1992; Rümmerzapf *et al*, 1991; Thiel *et al*, 1991; Weiland *et al*, 1992; Huist *et al*, 1993; Muyldermans *et al*, 1993; Kassimi *et al*, 1996); y las proteínas no estructurales correspondieron a las de 30, 22, 23 y 7 kD (Enzmann & Weiland, 1988; Huist *et al*, 1990; Heinz *et al*, 1991-1992; Stark *et al*, 1993; Mendoza, 1995; Kassimi *et al*, 1996; Knut *et al*, 1996); y también se detectaron varias proteínas de la cepa ALD, previamente reportadas por Mendoza (1995), con PM de 206, 161, 151, 98, 60, 30 y 23 kD.

En ambas cepas, de acuerdo a lo mencionado anteriormente, se detectaron varias proteínas consideradas en la literatura; y también se observó que hubo proteínas diferentes entre ambas cepas. Las proteínas diferentes detectadas fueron: para la cepa vacunal PAV-250, la de 87, 77, 64, 41 y 23 kD; que son para la cepa ALD las proteínas de 206, 98 y 36 kD. También se observaron dos proteínas comunes a ambas cepas con PM de 219 y 30 kD (Cuadro 11). La proteína de 219 kD ha sido mencionada por Mendoza (1995) y también en este trabajo, y no había sido reportada anteriormente en otras cepas del VFPC. Las proteínas detectadas concuerdan con las descritas por varios autores, como proteínas pertenecientes al VFPC (Cuadro 12).

La variabilidad del PM, observada entre algunas de las proteínas detectadas esta dentro de lo permisible, de acuerdo con Wensvoort *et al* (1990) (o sea 1 ó 2 kD); sin embargo se deberán hacer estudios posteriores, para corroborar si efectivamente son las reportadas en la literatura, determinando si corresponden o no a la misma proteína. Las proteínas de bajo PM encontradas, quizá pertenezcan al metabolismo de la propia célula, por lo que probablemente no sean componentes del virus, o importantes para el virus (Elbers *et al*, 1996).

Con respecto a los resultados de las pruebas de inmunotransferencia (IT), tendientes a investigar si los sueros inmunes producidos en los diferentes grupos de cerdos reconocían o no, las proteínas de ambas cepas, para determinar si había o no diferencias entre las dos cepas en estudio, de acuerdo con la respuesta dinámica serológica de los grupos de cerdos, se observó que tal como se esperaba los sueros de los grupos II, III, IV y V, detectaron tanto las proteínas del antígeno-PAV-250 (Ag-PAV-250) como a las del antígeno-ALD (Ag-ALD), cuando los sueros inmunes se hicieron reaccionar contra ambos antígenos. Las proteínas detectadas concuerdan con las previamente informadas por varios autores con respecto al VFPC.

Las proteínas que se detectaron contra el Ag-PAV-250 con los sueros de los diferentes grupos y con los correspondientes muestras (Cuadros 13 al 17 y 23; Figuras 13 a la 16) fueron las siguientes:

El día 15, los sueros del grupo vacunado y de los vacunados e inoculados, detectaron proteínas diferentes entre sí con PM de 87 y de 31 kD, mientras que el suero del grupo inoculado no detectó proteínas ese día.

El día 20, los vacunados y vacunados e inoculados detectaron proteínas diferentes entre sí, con PM de 169, 135 y 35 kD; y el suero del grupo inoculado sólo detectó la proteína de

99 kD. Hubo dos proteínas que fueron diferentes entre los grupos vacunados, y el vacunado e inoculado (II y IV), la de 169 y 135 kD respectivamente; y hubo proteínas iguales de 99 kD (grupos III y V) y de 85 kD (grupos II y V).

El día 25, sólo se detectó una proteína de 98 kD con los sueros de los vacunados (II) y vacunados e inoculados (IV); por otra parte, los sueros de los inoculados (III) no detectaron proteínas.

El día 30, los vacunados y los vacunados e inoculados sólo reconocieron a la proteína de 99 kD, y los inoculados no reconocieron proteínas.

Las proteínas detectadas con los sueros fueron estructurales (de envoltura) (proteína de 98 y 31 kD) y propias de la cepa PAV-250 y ALD (proteínas de 169, 135, 99, 98 y 87 kD), y una proteína de 85 kD, que pertenece a la cepa ALD, de acuerdo con Mendoza (1995) (Purchio et al, 1984, Wensvoort, 1989 y Wensvoort et al, 1990, 1993; Hulst et al, 1993; Mendoza, 1995; Kassimi et al, 1996 y Windisch et al, 1996); los sueros de los cerdos vacunados y de los vacunados e inoculados (grupos II, IV y V) reconocieron mayor número de proteínas de la PAV-250, que los sueros de los que sólo recibieron la cepa ALD (Grupo III) (Cuadro 23). Las proteínas detectadas con los sueros de los vacunados y vacunados e inoculados, que fueron diferentes entre estos grupos, fueron las de 87 y 31 kD, el día 15; y las proteínas de 169 y 135 kD, el día 20; el resto de los días (25 y 30) fueron detectadas las mismas proteínas (las de 99 y 98 kD) por los mencionados grupos (Cuadro 23).

Se observó que las proteínas de 135 y 87 kD fueron detectadas con los sueros de los vacunados, pero no con los inoculados, ni con los vacunados e inoculados. Por otra parte las proteínas de 169 y 31 kD fueron detectadas con los sueros de los vacunados e inoculados, pero no con los de los vacunados, ni con los inoculados. Los sueros de los cerdos inoculados sólo detectaron la proteína de 99 kD (Cuadro 23).

La proteína contra la que reaccionaron los sueros de todos los grupos fue la de 99 kD, los días 20 y 30; los sueros de los grupos vacunados y vacunados e inoculado, reaccionaron contra la de 85 kD, el día 20 del experimento.

El mejor reconocimiento de proteínas de la PAV-250, se observó los días 20 y 25 del experimento y fue con los sueros de los vacunados y vacunados e inoculados (Grupos II, IV y V); y hubo muy escaso reconocimiento con los inoculados (Grupo III) (Cuadro 23).

El día 15, los sueros de los centíneas de los vacunados, reconocieron sólo la proteína de 87 kD; el día 20, 25 y 30 los vacunados y los vacunados e inoculados, detectaron la proteína de 99 kD; y los inoculados, la de 98 kD solamente el día 25. En general las proteínas anteriormente mencionadas que fueron detectadas por los centíneas, también fueron reconocidas por sus grupos correspondientes (99, 98 y 87 kD). Estas proteínas las describió Mendoza (1995), para las cepas PAV-250 y ALD; por lo cual se considera que fueron proteínas del VPPC. También se detectó una proteína que de acuerdo con Mendoza (1995), sólo está presente en la cepa ALD (87 kD), por lo que se puede considerar que la cepa ALD fue la que estuvo circulando hacia los cerdos centíneas.

Las proteínas encontradas al hacer reaccionar los sueros de los grupos vaciados, contra el Ag-ALD, (Cuadro 18 a 23, Figuras 13 a la 16) fueron las siguientes.

El día 15, las proteínas de 61, 50 y 41 kD fueron detectadas por: el grupo de vacunados (41 kD); vacunados e inoculados (61 y 53 kD); y por los inoculados (61 y 41 kD). La proteína de 50 kD, la detectaron los grupos de vacunados e inoculados (IV y V); la proteína de 61 kD, fue detectada por los inoculados (II), y por los vacunados e inoculados; y la proteína de 41 kD que fue detectada por el grupo de vacunados (II) y por los inoculados (III).

El día 20, se reconocieron en casi todos los grupos (II, III, IV y V) las mismas proteínas de PM de 85, 78, 50, 39, 35 y 32 kD. Sólo los vacunados no reconocieron dos proteínas, las de 78 y 50 kD. Y los inoculados no reconocieron la proteína de 39 kD presente en los demás grupos (II, IV y V).

El día 25, del experimento se reconocieron pocas proteínas con respecto al muestreo anterior. Los vacunados y vacunados e inoculados (grupos II, IV y V) reconocieron las mismas proteínas con PM de 238 y 77 kD; los vacunados (Grupo II) no reconocieron la proteína de 50 kD, que sí reconocieron los vacunados e inoculados (Grupo IV); y la de 65 kD no estuvo presente en los sueros de los vacunados e inoculados (grupos IV y V), y sólo fue reconocida por los vacunados (II) y por los inoculados (Grupo III). Los inoculados (Grupo III) no reconocieron las proteínas de 238, 77 y 50 kD.

El día 30, las proteínas detectadas fueron las mismas para los grupos vacunados, inoculados y vacunados e inoculados, con PM de 206 y 99 kD. Los vacunados no reconocieron las de 78, 52 y 48 kD; y los vacunados e inoculados no reconocieron las de 39 y 38 kD.

De acuerdo a la literatura consultada (Donis *et al*, 1980, 1984; Purcino *et al*, 1984; Collet *et al*, 1988; Magar *et al*, 1988; Ensmann & Weiland, 1988; Wensvoort *et al*, 1989, 1990; Emile, 1990; May *et al*, 1991; Roehle *et al*, 1991; Hulst *et al*, 1993; Muyldermans *et al*, 1993; Mendoza, 1995; Kassimi *et al*, 1996; Windisch *et al*, 1996), al trabajar con los sueros inmunes de los diferentes grupos de cerdos (II, III, IV y V), en el Ag-ALD se reconocieron proteínas estructurales del VPFC, correspondientes a la envoltura (proteínas con PM de 65, 52, 50, 48, 41, 39, 35 y 32 kD); también se reconocieron proteínas no estructurales (proteínas con PM de 78, 77 y 38 kD). Y en este trabajo se detectaron además proteínas correspondientes a la cepa ALD, con PM de 206, 99, 85, 78, 77, 65, 61 y 38 kD, que fueron observadas también por Mendoza (1995). Los sueros reaccionaron más frecuentemente contra las siguientes proteínas: 238, 206, 99, 85, 78, 39, 35 y 32 kD (Cuadro 23). El mejor reconocimiento de las proteínas fue los días 20 y 30 del experimento.

Con respecto a los cerdos cerdinas se observó lo siguiente: el día 15, los sueros de los vacunados detectaron la proteína de 41 kD; los inoculados las proteínas de 61 kD; los vacunados e inoculados las proteínas de 61 y 50 kD. El día 20, los vacunados y vacunados e inoculados reconocieron las mismas proteínas de 85, 39, 35 y 32 kD, reaccionaron más a la proteína de 85 kD. Los inoculados detectaron las proteínas de 78, 35 y 32 kD. El día 25, los inoculados sólo reconocieron la proteína de 65 kD. El día 30, los vacunados y vacunados e inoculados reconocieron las proteínas de 206, 99, 78, 61, 52, 48 y 38 kD; y los inoculados sólo las de 206 y 99 kD (Cuadro 23).

Las proteínas reconocidas por los sueros de los cerdinas fueron prácticamente las mismas detectadas por los grupos tratados (II, III, IV y V); también detectaron proteínas

propias de las cepas PAV-250 y ALD; así como dos proteínas de la cepa ALD (25 y 78 kD), mencionadas por Mendoza (1995). Al hacer reaccionar los sueros de los centinelas contra el Ag-PAV-250 y contra el Ag-ALD, en ambos casos se detectaron las dos proteínas (25 y 78 kD) que sólo están presentes en la cepa ALD, por lo cual se puede considerar que los mencionados centinelas se infectaron con esta última cepa, la cual fue excretada por los cerdos inoculados.

Refiriéndose de nuevo a los sueros de los grupos, cuando éstos se hicieron reaccionar con el Ag-ALD se observó que algunos grupos de sueros colectados en la misma fecha, detectaban determinadas proteínas, mientras que otros no. Ya que el día 15 la proteína de 41 kD, no se detectó con los vacunados e inoculados; la proteína de 50 kD, no fue detectada con los inoculados, ni con los vacunados, y la de 61 kD no fue detectada con los vacunados. El día 20, las proteínas de 78 y 50 kD no fueron detectadas con los sueros de los vacunados, y la de 39 kD no reaccionó con los inoculados. El día 25 las proteínas de 238, 77 y 50 kD no fueron detectadas por los inoculados. El día 30, las proteínas de 52 y 48 kD no fueron detectadas por los vacunados y las proteínas de 78, 52, 48, 39 y 38 kD, no reaccionaron con los sueros de los inoculados. Aclarando que en cada fecha mencionada los sueros de los demás grupos sí detectaron la o las proteínas correspondientes (Cuadro 23).

Ya en conjunto, los sueros de los cerdos vacunados detectaron las siguientes proteínas del Ag-ALD: 238, 206, 99, 85, 77, 65, 61, 41, 39, 38, 35 y 32 kD. Los sueros de los vacunados e inoculados reaccionaron con las siguientes proteínas: 238, 206, 99, 85, 78, 77, 61, 52, 50, 48, 39, 35 y 32 kD. Y los sueros de los inoculados identificaron las proteínas siguientes: 206, 99, 78, 65, 61, 50, 41, 35 y 32 kD (Cuadro 23).

Por otra parte, tratándose del Ag-PAV-250, los sueros de los cerdos vacunados detectaron las siguientes proteínas: 135, 99, 98, 87 y 85 kD. Los sueros de los vacunados e inoculados detectaron las proteínas 169, 99, 98, 85 y 31 kD. Y los sueros de los inoculados sólo reconocieron la proteína de 99 kD (Cuadro 23).

Se puede observar que los diferentes grupos de sueros identificaron un número mucho mayor de proteínas ante el Ag-ALD que ante el Ag-PAV-250. Al tratar de determinar si los sueros de los grupos detectaron proteínas ante uno de los dos antígenos, que no estuvieron presentes en el otro antígeno, se observó lo siguiente: las proteínas que estuvieron presentes en el Ag-PAV-250 y no en el ALD fueron las de 169, 135, 98 y 87 kD. De estas cinco proteínas, sólo las de 169 y 135 kD se diferencian claramente por su *PM*, de las detectadas con el Ag-ALD; estas dos proteínas fueron detectadas con los sueros de los vacunados y de los vacunados e inoculados (Cuadros 23 y 24). Lo cual deberá ser corroborado mediante otros experimentos. Y en el caso de que este resultado fuera seguro, se recomendaría entonces investigar si sucede lo mismo al estudiar las proteínas de diferentes cepas de campo de FPC. Y si siguen siendo válidos los resultados, se podría recomendar abrir una línea de investigación tendiente a obtener una prueba serológica práctica y rápida que diferencie entre la infección producida por la vacuna PAV-250 y la infección producida por las cepas de campo de FPC.

Por otra parte, al evaluar las proteínas del Ag-ALD, se encontró que las proteínas siguientes no estuvieron presentes en el Ag-PAV-250: 238, 206, 78, 77, 65, 61, 52, 50, 41, 35, 38 y 32 kD (Cuadros 23 y 24).

De lo antes mencionado las proteínas del Ag-PAV-250 detectadas fueron las de 169, 135, 99, 98, 87 y 31 k μ ; y las proteínas diferentes con respecto al Ag-ALD fueron las de 169 y 135 k μ (detectadas con los sueros de los vacunados y vacunados e inoculados). Las proteínas diferentes del Ag-ALD, con respecto al Ag-PAV-250 fueron las de 238, 206, 78, 77, 65, 61, 52, 50, 41, 39, 35 y 32 k μ (Cuadro 24). Como puede observarse, las proteínas detectadas por los sueros de los grupos (tratados al hacerlos reaccionar contra el Ag-PAV-250 fueron diferentes, de las proteínas detectadas con el Ag-ALD, estas proteínas podrán considerarse importantes para ver la respuesta de los sueros policlonales ante el antígeno presente.

Los sueros reconocieron la proteína de 87 k μ del VFPC partir del día 15 del experimento, para el Ag-PAV-250; y los cerdos centinelas reconocieron también esta proteína. Refiriéndose a las proteínas contra el Ag-ALD, éstas se reconocieron a partir del día 15. Hubo un mayor reconocimiento de proteínas de la ALD los días 20 y 30 del experimento, y este reconocimiento de proteínas fue mínimo los días 15 y 25. En el caso de PAV-250 se reconocieron menos proteínas, y la frecuencia fue más homogénea en los diferentes muestreos (Figuras 13 a la 16).

Enzmann (1988), menciona que la reactividad de los péptidos de alto PM del VFPC con los anticuerpos, depende del origen del suero inmune. Ya que los sueros de los cerdos convalecientes usualmente precipitan péptidos de alto PM en un grado mayor, que cuando se utilizan sueros hiperinmunes, obtenidos por inoculación con virus purificado; ya que en este último caso se detectan péptidos de bajo PM. O sea que la reactividad del virus contra los anticuerpos de diferentes procedencias, parece depender de la presencia o ausencia de péptidos de alto o de bajo PM. En este trabajo, en el caso del Ag-PAV-250 se detectaron mayormente proteínas de alto PM, que de bajo PM. Y en el caso del Ag-ALD hubo proteínas tanto de alto como de bajo PM (Cuadros 23 y 24; Figuras 13 a la 16).

Se pudo observar que hubo proteínas comunes, que hicieron que los sueros reaccionaran contra ambas cepas, y correspondieron a las proteínas de 99 y 85 k μ (Cuadro 24).

Además de las proteínas mencionadas en los párrafos anteriores, las cuales concuerdan con la literatura consultada, también se detectaron proteínas que no están reportadas en la literatura. Estas proteínas se detectaron en los diferentes grupos de cerdos (II, III, IV y V), pero más frecuentemente en el Grupo IV, y fueron las siguientes: para el Ag-PAV-250 las proteínas de 134 y 72 k μ (Cuadros 14 al 17). Para el Ag-ALD fueron las proteínas de 223, 218, 200, 190, 188, 175, 157, 154, 132, 109, 102 y 72 k μ (Cuadros 19 al 22).

De lo anterior se deduce que los sueros de los 4 grupos tratados, reaccionaron ante ambas cepas estudiadas (PAV-250 y ALD), de acuerdo a lo esperado, pero no de igual manera, como puede observarse en los resultados (Figuras 13 a la 16). El uso de la prueba de IT, permitió la detección de diferencias entre las proteínas de ambas cepas (PAV-250 y ALD), tanto en lo referente al PM, como por el número de proteínas. Al utilizar los sueros de los diferentes grupos (II, III, IV y V); los sueros detectaron un mayor número de proteínas cuando se hicieron reaccionar contra el Ag-ALD, que cuando se pusieron en contacto con el Ag-PAV-250 (Cuadro 23)

Se puede mencionar también, que los sueros de los grupos I, III, IV y V, reconocieron tanto proteínas estructurales de envoltura, como no estructurales, del VFPC; y otras proteínas previamente reportadas, para ambas cepas (PAV-250 y ALD). Y lo encontrado en este trabajo concuerda con los autores citados. El hecho de haber encontrado básicamente proteínas relacionadas con la envoltura del virus, esté de acuerdo a lo reportado en la literatura, en la cual se menciona que dichas proteínas son importantes, ya que participan en el curso de la infección y representan un blanco importante para la respuesta inmune del hospedador, lo que demuestra que los cerdos respondieron inmunológicamente a ambas cepas, ya que sus sueros fueron capaces de detectar a las proteínas del VFPC.

Las proteínas que no estén consideradas en la literatura, pero que se encontraron en los controles usados de las pruebas de SDS-PAGE e IT, no se tomaron en cuenta, ni se consideraron importantes, dado que no se pudo corroborar que fueran proteínas pertenecientes al VFPC. Sin embargo, hubo otras proteínas que se detectaron en el presente trabajo y que no son mencionadas en la literatura, y que puede tratarse de proteínas importantes para cada una de las cepas; aunque deberán hacerse estudios posteriores para corroborar que sean legítimas.

CONCLUSIONES.

- Se pudo estimar la dilución correcta ($10^{6.0}$ /ml) de la cepa ALD, para producir el suero inmune contra esta cepa, con base en el procedimiento descrito de inoculación con dosis ascendentes del virus.
- Se obtuvo además el suero inmune contra la cepa vacunal PAV-250; y contra la PAV-250 y la cepa patógena ALD; contra la cepa patógena ALD; y el suero de los controles.
- Los anticuerpos virusneutralizantes (IP) producidos por los cerdos vacunados con PAV-250, fueron detectados a partir de los 15 y 20 días postvacunación.
- En los cerdos inoculados con la "cepa" ALD, la seroconversión fue detectada por IP a partir de los 25 días.
- Cuando se aplicó una y dos dosis de vacuna y después se inoculó con la cepa ALD, los anticuerpos (IP), se detectaron a partir de los 15 y 20 días postvacunación.
- La vacuna PAV-250 protegió a los cerdos vacunados con una y dos dosis, ante la inoculación con la cepa patógena ALD; y con base en los resultados obtenidos se evitó más la excreción del virus virulento, cuando se vacunó con dos dosis, que con una dosis.
- En los cerdos centinelas de los grupos II, III, IV y V, no se detectaron títulos de anticuerpos; pero sí se detectaron bandas de proteínas mediante las pruebas de IT, contra ambas cepas (PAV-250 y ALD).
- En el perfil electroforético obtenido con las cepas vacunal PAV-250 y patógena ALD, se detectaron varias proteínas del VFPC previamente reportadas en la literatura, que han sido detectadas a partir de otros VFPC.
- Mediante la electroforesis se observó que ambas cepas mostraron algunas proteínas diferentes en cuanto a su PM; para la cepa ALD, las de 206, 98 y 36 kd; y para la PAV-250, las de 87, 77, 64, y 41 kd.
- En las pruebas de inmunotransferencia, los sueros de los grupos reaccionaron a los antígenos de la cepa vacunal PAV-250 y a la cepa patógena ALD, de acuerdo a lo esperado. Sin embargo, no reconocieron proteínas contra ambas cepas de manera idéntica; ya que los sueros de los grupos reconocieron mayor número de proteínas de la cepa ALD, que de la PAV-250.
- Las proteínas detectadas tanto en las pruebas de electroforesis (SDS-PAGE), como en las de inmunotransferencia, correspondieron a la parte estructural (envoltura) y a la parte no estructural del VFPC.
- Hubo mejor respuesta de reconocimiento de proteínas por parte de los sueros, ante la cepa patógena ALD de FPC, que ante la cepa vacunal.
- Se reconocieron menos proteínas con la PAV-250, y con una frecuencia más homogénea en los diferentes muestreos.
- Hubo un mayor reconocimiento de proteínas PAV-250 los días 20 y 25 del experimento.
- Hubo un mayor reconocimiento de proteínas ALD los días 20 y 30 del experimento.
- En el caso de la cepa PAV-250 se reconocieron por IT principalmente proteínas de alto PM; y en el caso de la cepa ALD fueron de alto y de bajo PM.

- o La técnica de inmunotransferencia permitió detectar diferentes proteínas entre las cepas en estudio (PAV-250 y ALD), al hacerlas reaccionar con los sueros de los grupos II, III, IV y V.
- o La prueba de inmunotransferencia permitió la detección de diferencias entre ambas cepas, tanto de PM como del número de proteínas.
- o Los cerdos centinelas reconocieron varias de las proteínas virales que también aparecieron en los cerdos vacunados y/o inoculados; y dado que dos de esas proteínas correspondieron a la cepa patógena ALD, se concluyó que ésta fue la que estuvo circulando.
- o Las proteínas que estuvieron presentes en la PAV-250 y no en la ALD fueron las de 169, 135, 98 y 87 kd. De éstas sólo las de 169 y 135 kd se diferenciaron por su PM, de las detectadas con el Ag ALD.
- o Las proteínas de la PAV-250 que fueron diferentes respecto al Ag ALD fueron las de 169 y 135 kd.
- o Las proteínas de la ALD que fueron diferentes a las de la PAV-250, fueron las de 238, 206, 78, 77, 65, 61, 52, 50, 41, 39, 35 y 32 kd.

RECOMENDACIONES :

- o Los resultados obtenidos en este trabajo deberán ser corroborados mediante otros experimentos, tendientes a investigar si sucede lo mismo al estudiar las proteínas de diferentes cepas de campo de FPC. Y con estos resultados, se podría abrir una línea de investigación tendiente a obtener una prueba seriológica práctica y rápida que diferenciara entre la infección producida por la vacuna PAV-250 y la infección producida por las cepas de campo de FPC.

CUADRO 12. PROTEINAS DEL VFPC INFORMADAS EN LA LITERATURA Y LAS DETECTADAS EN LAS CEPAS PAV-250 Y ALD DEL VFPC (Mendoza, 1995; modificado).

REFERENCIA	PROT. REPORT.	DETECTADAS EN EL PRESENTE TRABAJO	
		CEPA PAV-250	CEPA ALD
Mendoza, 95	257 252		
Mendoza, 95	239 235 233 231		
Mendoza 95	226		
Mendoza, 95	218 212	219	219
Mendoza, 95	207 205 203		206
Mendoza, 95	188 187		
Mendoza, 95	177 175 174 173 172		
Mendoza, 95	169 168		
Mendoza, 95	160.3		161
Mendoza, 95	152.5 151		151
Mendoza, 95	139		
Mendoza, 95	135		
Graiser-Wilke, 92	125		
Kassimi <i>et al.</i> , 96	145		
Mty.Germans <i>et al.</i> , 93 Kassimi <i>et al.</i> , 96 Wensvoort <i>et al.</i> , 90	120		

Donis <i>et al.</i> , 80	118	118	
Collet <i>et al.</i> , 88	116		
Purchio <i>et al.</i> , 84	115		
Mendoza, 95	110,9	111	111
Pritchett <i>et al.</i> , 75	110		
Kassiri <i>et al.</i> , 95	107		
Koenig <i>et al.</i> , 95	108		
Mendoza, 95	99		98 *
Hulst <i>et al.</i> , 93	97		
Windisch <i>et al.</i> , 95			
Rümenapf <i>et al.</i> , 91	90-100		
Pritchett <i>et al.</i> , 75	93-93		
Wensvoort <i>et al.</i> , 90			
Wensvoort <i>et al.</i> , 90	90		
Wensvoort <i>et al.</i> , 90	89-87	87	
Mendoza, 95	87,2		
Purchio <i>et al.</i> , 84	84		
Purchio <i>et al.</i> , 81	80		
Greisser-Wilke <i>et al.</i> , 92			
Emile <i>et al.</i> , 90	80-100		
Kassiri <i>et al.</i> , 95	76	77*	
Koenig <i>et al.</i> , 95	75		
Wensvoort <i>et al.</i> , 90	70		
Pritchett <i>et al.</i> , 75	70-69		
Hulst <i>et al.</i> , 93			
Rümenapf <i>et al.</i> , 91	68	68	68
Donis <i>et al.</i> , 84	65	64*	
Lozmann & Weland, 88			
Muydermans <i>et al.</i> , 93			

Collet <i>et al</i> , 95	62		
Mendoza, 95	50.7		
Mathews, 79	57		
	55-65	56	
Wilke <i>et al</i> , 90 Donis <i>et al</i> , 80			
Wensvoort <i>et al</i> , 90 Heinz <i>et al</i> , 91-92 Rümenapf <i>et al</i> , 91 Köning <i>et al</i> , 95 Kassimi <i>et al</i> , 96 Purchio <i>et al</i> , 80 Thiel <i>et al</i> , 91 Muyldermans <i>et al</i> , 93 Rümenapf <i>et al</i> , 91	55-57 55		
Wensvoort <i>et al</i> , 90 Moormann <i>et al</i> , 90 Rijn <i>et al</i> , 93	54 54-51		
Collet <i>et al</i> , 88 Emilie <i>et al</i> , 90 Roche <i>et al</i> , 91	53-54 53-53 53		
Wensvoort <i>et al</i> , 90 Maddy <i>et al</i> , 91 Wensvoort <i>et al</i> , 90 Donis <i>et al</i> , 80	51-53 51-54 54 48		50*
	47	47	
Wensvoort <i>et al</i> , 90 Hulst <i>et al</i> , 93 Muyldermans <i>et al</i> , 93			
Purchio <i>et al</i> , 80	45		
Heinz <i>et al</i> , 91-92 Rümenapf <i>et al</i> , 91 Emilie <i>et al</i> , 90 Kassimi <i>et al</i> , 96 Thiel <i>et al</i> , 91 Welland <i>et al</i> , 92 Wensvoort <i>et al</i> , 90 Hulst <i>et al</i> , 93 Mathews, 79	44-48 44-46		44
Wensvoort <i>et al</i> , 90 Magar <i>et al</i> , 88	42-39		

Muydermans <i>et al</i> , 93	40	41	
Muydermans <i>et al</i> , 93	39		
Kassimi <i>et al</i> , 96 Wensvoort <i>et al</i> , 90	38		
Wensvoort <i>et al</i> , 90	35-32		
Wensvoort <i>et al</i> , 90	34-36	34	36
Heinz <i>et al</i> , 91-92 Rümenapf <i>et al</i> , 91 Kassimi <i>et al</i> , 96 Tiniel <i>et al</i> , 91 Emilie <i>et al</i> , 90	33 25-33		
Wensvoort <i>et al</i> , 89 Kassimi <i>et al</i> , 96 Hulst <i>et al</i> , 93 Wensvoort <i>et al</i> , 93	31-32 31		
Erzman & Weilan, 88 Hulst <i>et al</i> , 90	30	30	30
Mendoza, 95	29.4		
Wensvoort <i>et al</i> , 90 Mendoza, 95	27-24 27.5	27	
Muydermans <i>et al</i> , 93 Fritchett <i>et al</i> , 75	27 26-25		
Fritchett <i>et al</i> , 75 Rümenapf <i>et al</i> , 89-91	24-23		
Mendoza, 95 Stark <i>et al</i> , 93 Kassimi <i>et al</i> , 96 Heinz <i>et al</i> , 91-92	23.8 23 23-23	23	22
Wensvoort <i>et al</i> , 90	31-19	19	
Muydermans <i>et al</i> , 93	16		17*

CUADRO 13. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE INMUNOTRANSFERENCIA. GRUPO I.- SUEROS DE LOS CERDOS CONTROLES NEGATIVOS CONTRA EL ANTIGENO PAV-250.

PMA/ke	DIAS :						
	1	5	10	15	20	25	30
	Muestreo						
	1	2	3	4	5	6	7
200							
100	139 (1/4)	130 a 24 (1/4)	141 (1/4)	139 (1/4)		131 (1/4)	
	129 (1/4)			127 (1/4)	125 (1/4)	121 (1/4)	
	111 (1/4)	118 (1/4)	125 (1/4)	116 a 96 (3/4)	115 (2/4)		
50					107 (2/4)		
	39 (1/4)				105 (1/4)	92 (1/4)	89 (3/4)
						83 (1/4)	81 (1/4)
20							42 (1/4)
0							
Acs LP.	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4

Acs LP. = Anticuerpos contra TPC detectados por la técnica de Inmunoprecipitación; (Nº. de cerdos que detectaron la banda de proteína / Nº. de cerdos).

CUADRO 14. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE INMUNOTRANSFERENCIA. GRUPO I. - SUEROS DE CERDOS VACUNADOS CON UNA DOSIS DE PAV-250 CONTRA EL ANTIGENO PAV-250.

PAG/AC	DÍAS													
	1		5		10		15		20		25		30	
	Muestras		2		3		4		5		6		7	
	Vac	Cen	Vac	Cen	Vac	Cen	Vac	Cen	Vac	Cen	Vac	Cen	Vac	Cen
200							253 (1/4)							
			130 ^a 118 (1/4)			118 (2/4)	118 (1/2)		135 ^a (1/4)			121 (1/4)		
			112 (1/2)				116 ± 96 (1/4)	116 ± 96 (1/2)			107 (2/4)	107 (1/2)		
100					104 (1/4)									
							87 (1/4)	87 (1/2)			57 ^a ± 83 (1/4)			
50	89 (1/4)							85 (1/4)			89 ± 83 (1/4)	89 (1/2)		
													81 (1/4)	81 (1/2)
20													1,2 23 (1/4)	27 ^{1,2} (1/2)
0	Vac PAV- 250													
Acs L.P.	0/4	0/2	0/4	0/2	0/4	0/2	1/4	0/2	3/4	0/2	4/4	0/2	4/4	0/2

Vac = Vacunados; Cen = Controlas; Vac PAV-250 = Día en que se realizó la vacunación; Acs L.P. = Anticuerpos contra EPC detectados por la técnica de Luminoperoxidasas; (No. De cerdos que detectaron la banda de proteína/No de cerdos); ^a = proteínas reconocidas en la PAGE realizadas en este estudio; ^b = proteínas manoteñidas en la Western blotting.

CUADRO 15. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE INMUNOTRANSFERENCIA. GRUPO III. - SUEROS DE CERDOS INOCULADOS CON LA CEPA PATOGENA ALD-FPC, CONTRA EL ANTIGENO PAV-250.

PM/kd	DIAS 1		5		10		15		20		25		30	
	Muestras 1		2		3		4		5		6		7	
	Susc	Gen	Susc	Gen	Inoc	Gen	Inoc	Gen	Inoc	Gen	Inoc	Gen	Inoc	Gen
200														
100				118 (1/2)	118 (3/4)			116 ± 88 (1-0)	116 ± 96 (1/2)		115 (1/4)		107 (1/2)	
							105 ± 87 (1/4)							
50									89 ± (1/4)				2 27 (1/2)	
		89 (1/4)						72 (1/4)	65 (1/4)	65 (1/2)		83 (1/4)	83 (1/2)	
20														27 ± (1/2)
0														23 ± (1/2)
Acs. I.P.	0/4	0/2	0/4	0/2	0/0	0/2	0/0	0/2	0/0	0/2	1/4	0/3	1/4	0/2

Sus = Cerdos Susceptibles a FPC; Inoc = Cerdos Inoculados; ± Inoc ALD = Día en que se realizó la inoculación de los cerdos con la cepa ALD; 1 = proteínas presentes en el gel PAGE; 2 = proteínas reconocidas en la literatura consultada; Acs I.P. = Anticuerpos contra FPC detectados por la técnica de inmunoprecipitación; (No de cerdos que detectaron la banda de proteínas de cerdos).

CUADRO 16. RESULTADO DE LAS PRUEBAS DE INMUNOTRANSFERENCIA. GRUPO IV. - SUEROS DE CERDOS VACUNADOS CON UNA DOSIS CEPA PAV-250 Y DESAFIADOS CON LA CEPA ALD-FPC, CONTRA EL ANTIGENO PAV-250.

PM/Kd	DIAS		5		10		15		20		25		30	
	Muestreo		2		3		4		5		6		7	
	Vac	Con	Vac	Con	Vac y Des	Con	Vac y Des	Con	Vac y Des	Con	Vac y Des	Con	Vac y Des	Con
200							222 (1/4)							
100			130 a 48 (1/4)			118 (2/2)	2 155 (1/4)		169 (1/4)					
			112 a 101 (1/4)				116 a 96 (1/4)	116 a 87 (1/2)		115 (1/2)		2 112 a 97 (1/2)		
					104 (1/4)		105 (1/4)	105 a 80 (1/2)		107 (3/4)	107 (1/2)		12 97 (1/4)	12 97 a 53 (1/2)
50	89 (1/4)									92 (3/4)	92 (1/2)		83 (3/4)	83 (1/2)
							72 (1/4)							81 (3/4)
20														
0	Vac. PAV- 250				Desa- ño con ALD									
Acs I.P.	3/4	0/2	0/4	0/2	0/6	0/2	4/6	0/2	4/6	0/2	4/6	0/2	4/6	0/2

Vac = Vacunados; Des = Desafíos; Vac PAV-250 = Día en que se realizó la vacunación; Desafío con ALD = Día del desafío con la cepa ALD; 1 = proteínas presentes en el gel PAGE; 2 = proteínas reconocidas en la literatura consultada; Des = Desafíos; Acs I.P. = Anticuerpos contra FPC detectados por la técnica de inmunoprecipitación; (No de cerdos que detectaron la banda de proteína/No de cerdos).

CUADRO 17. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE INMUNOTRANSFERENCIA. GRUPO V. - SUEROS DE CERDOS VACUNADOS CON DOS ECSIS DE LA CEPA PAV-250 Y DESAFIADOS CON LA CEPA ALD-FPC, CONTRA EL ANTIGENO PAV-250.

PM/Kcd	DIAS														
	1		5		10		15		20		25		30		
	Muestreo 1		2		3		4		5		6		7		
	Vac	Cen	Vac	Cen	Vac y Des	Cen	Vac	Ce y Des	Vac	Cen	Vac y Des	Cen	Vac y Des	Cen	
200															
100			137 (1/4)					127 (2/4)						134 (1/4)	134 (2/2)
			124 ^a 118 (1/4)		118 (1/4)	118 (1/2)		116 ^a 80 (2/4)			115 (1/4)				
					111 (2/4)				105 (2/2)		107 ^a 92 (1/4)	107 (1/2)			
50							96 (1/4)		99 ² (1/4)					96 (1/4)	
									92 (1/4)	92 (2/2)	89 (1/4)				
											83 (1/4)	83 (1/2)		81 (2/4)	81 (2/2)
20								31 ^{1,2} (1/4)							12 27 (1/2)
0	Vac. PAV- 250				2 ^o Vac. PAV- 250	Desa- fio con ALD									
Acs I.P.	0/4	0/2	0/4	0/2	0/4	0/2	2/4	0/2	3/4	0/2	4/4	0/2	4/4	0/2	

{ Vac = Vacunados; Des = Desafidos; Vac PAV-250 = Día en que se realizó la vacunación y 2^o vacunación; Desafio con ALD = Día del desafío con la cepa ALD; 1 = proteínas presentes en el gel PAGE; 2 = proteínas reconocidas en la literatura consultada; Acs I.P. = Anticuerpos contra FPC detectados por la técnica de inmunoprecipitación; (No de cerdos que detectaron la banda de proteína/No de cerdos).

CUADRO 18. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE INMUNOTRANSFERENCIA. GRUPO I.- SUEROS DE LOS CERDOS CONTROLES NO INOCULADOS, CONTRA EL ANTIGENO DE LA CEPA VIRULENTE ALD.

PM/kd	DIAS 1	3	10	15	20	25	30
	Muestreo i	2	3	4	5	6	7
200				244 (1/4) 222 (1/4)	250 (3/4)		
100	195 (1/4) 153 a 79 (1/4) 120 a 100 (1/4)	150 (2/4) 125 (1/4) 103 a 45 (3/4)	113 a 75 (1/4)	149 (1/4) 122 (1/4) 100 a 75 (1/4) 75 a 55 (2/4)	172 (1/4) 144 (2/4) 121 (2/4) 111 (1/4)	100 a 59 (3/4)	137 a 117 (1/4) 117 a 61 (1/4)
50		94 (3/4) 79 (1/4) 71 (3/4) 59 (1/4)	96 a 69 (1/4) 54 a 53 (1/4)	91 a 55 (1/4)	78 (1/4) 65 a 42 (1/4) 60 a 45 (2/4)	92 a 59 (1/4)	96 a 55 (2/4)

20			30 a 23 (1/4)	20 (2/4)	45 a 42 (1/4) 42 a 39 (1/4) 39 a 32 (1/4) 35 a 30 (1/4) 32 a 25 (1/4) 27 (1/4) 25 (1/4) 21 (3/4)		29 a 23 (1/4)
0				17 (1/4)	16 a 12 (1/4) 15 a 11 (1/4) 13 (1/4) 11 (1/4)		
Acs LP.	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4

Acs LP. = Anticuerpos contra FPC detectados por la técnica de inmunoperoxidasa; (No se cerdos que detectaron la banda de proteína/No de cerdos).

CUADRO 19. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE INMUNOTRANSFERENCIA. GRUPO II. - SUEROS DE LOS CERDOS VACUNADOS CON UNA DOSIS DE LA CEPA PAV-250, CONTRA EL ANTIGENO DE LA CEPA VIRULENTE A.L.D.

PVL/kd	DIAS														
	I		5		10		15		20		25		30		
	Muestras		2		3		4		5		6		7		
	Vac	Cen	Vac	Cen	Vac	Cen	Vac	Cen	Vac	Cen	Vac	Cen	Vac	Cen	
200			287 (2/4) 238 (1/4)						250 (4/4)	250 (1/2)			233 ² (1/4)	223 (2/4) 205 ¹² (1/4)	205 ¹² (1/2)
									172 a 144 (1/4)					190 (3/4)	190 (1/2)
			150 (4/4)	150 (1/2)	145 (3/4)				157 (1/4)			156 (3/4)		137 a 117 (1/4)	137 (2/2)
	144 a 79 (4/4)	120 a 200 (2/2)							132 (3/4)			130 (1/4)		127 (1/4)	127 (1/2)
			113 a 59 (4/4)		113 a 69 (1/4)				121 (1/4)	121 (1/2)					117 (1/2)
			103 a 49 (1/4)	103 a 71 (1/2)		102 a 63 (2/4)									
100									102 (1/4)				100 a 77 (1/4) 100 a 71 (1/4)	100 a 55 (1/4)	100 a 59 (1/2)

50	55 (2/4)	94 (1/4)	94 (1/2)	96 a 63 (1/4)	96 a 58 (1/2)			93 a 78 (1/4)		92 a 59 (1/2)	99 a 44 (1 1/4)	99 a 44 (1.2)	
		71 (1/4)	65 (1/2)	1,2 88 a 63 (2/4)	1,2 88 a 63 (1/2)	91 a 50 (3/4)	91 a 50 (2/2)	2 85 (1/4)	2 85 (1/2)	1,2 77 a 65 (1/4)			
20	21 (1/4)	25 (1/4)	37 (1/4)	30 a 23 (1/4) 27 1 (1/4)	30 a 23 (1.2)		45 (1/2)	42 2 39 a (1/4)	35 2 27 a (1/4) 32 1 a 27 (1/4)	1,2 60 a 27 (2/2)	1,2 60 a 27 (1/4)	2 39 (1/4) 38 a 27 (1/4)	2 38 a 27 (1/2)
				20 (3/4)		41 1,2 (1/4)	41 1,2 (1/2)	39 2 35 a (1/4)	39 2 35 a (1/4)	35 2 27 a (1/4) 32 1 a 27 (1/4)	50 a 42 (1/4)	71 a 59 (1/4) 65 a 54 (1/4)	38 a 27 (1/4)

0	Vac PAV- 250		14 (1/4)					16 ¹ (1/2)	16 a 11 (1/4)	11 (1/2)				
Acs LP.	0/4	0/2	0/4	0/2	0/4	0/2	1/4	3/2	3/4	0/2	4/4	0/2	4/4	0/2

Vac PAV-250 = Día en que se realizó la vacunación; 1 = proteínas presentes en el gel PAGE; 2 = proteínas reconocidas en la literatura consultada. Acs LP. = Anticuerpos contra FPC detectados por la técnica de inmunoperoxidasa; (No de cerdos que detectaron la banda de proteína/No de cerdos).

CUADRO 20. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE INMUNOTRANSFERENCIA. GRUPO III. - SUEROS DE LOS CERDOS INOCULADOS CON LA CEPA PATOGENA ALD-FPC, CONTRA EL ANTIGENO DE LA CEPA ALD.

PM/kd	DIAS		5		10		15		20		25		30	
	Muestreo		2		3		4		5		6		7	
	Susc	Cen	Susc	Cen	Inoc	Cen	Inoc	Cen	Ino	Cen	Inoc	Cen	Inoc	Cen
200			287 (1/4)		282 (1/4)				290 (3/4)	293 (2/2)				284 (1/2) 223 (1/2) 235 ^{1/2} (1/2)
100	144 a 79 (4/4)	144 a 89 (2/2)	150 (3/4)		113 a 75 (2/4)		104 a 75 (1/4)		157 (1/4)	152 (1/4)			121 (1/4)	127 (1/2) 117 (1/2)
			113 a 59 (1/4)				100a50 (1/4)	100 a 61 (1/4)			100 a (1/4)	59 (1/4)	100 a 84 (1/2) 100 a 55 (1/2)	

			94 (1/2)		91 a 61 (1/4)	91 a 75 (1/2)			99 ^a 56 ² (1/2)
				68 a 69 (1/4)	91 a 68 (1/4)	91 a 65 (1/2)			
				69 (1/2)		91 a 50 (1/2)			
				² 75 a 63 (1/4)	² 75 a 61 (1/4)	75 (1/2)	¹ 73 (2/4)	¹ 73 (1/2)	
				75 a 58 (1/4)	63 (1/2)	75 a 61 (1/2)	72 (2/4)	72 (2/2)	
			71 (1/2)						
				69 a 54 (1/4)	^{1,2} 68 a 50 (1/4)				
					^{1,2} 61 a 50 (1/4)	^{1,2} 61 a 50 (1/2)	66 (1/4)	² 65 (1/4)	² 65 a 59 (1/2)
	55 (1/4)								
50							^{1,2} 60 a 42 (1/2)	59 (1/2)	
							^{1,2} 58 a 42 (2/2)		
							^{1,2} 60 a 42 (1/2)		
							^{1,2} 58 a 42 (2/2)		
							^{1,2} 60 a 42 (1/2)		
							^{1,2} 58 a 42 (2/2)		

									45^{12} α 42 (3/4)	43^{12} α 27 (1/2)				
								41^{12} (1/4)	42^{12} α 35 (3/4)	42^{12} α 27 (1/2)				
									35^{12} α 32 (3/4)	36^{12} α 27 (1/2)				
				22 (1/2)					32^2 α 27 (3/4)	32^2 α 25 (2/2)			27^{23} (1/2)	
									30 (1/4)					
									23^{12} (1/4)					
									21^{12} (3/4)	21^{12} (2/2)				
20														
									18^2 (3/2)	17 (1/4)	17 (1/2)			
											16^2 12 (1/2)			
									15^2 11 (2/4)	15^2 10 (2/2)				
									1 12 (1/4)					
									1 10 (1/4)					
									6 (1/4)					
0														
Acs LP.	0/4	0/2	0/4	0/2	0/4	0/2	0/4	0/2	0/4	0/2	1/4	0/2	1/4	0/2

* Díc en que se inocularen con ALD; 1 = proteínas presentes en el gel PAGE; 2 = proteínas reconocidas en la literatura consultada; Acs LP. = Anticuerpos contra EPC detectados por la técnica de inmunoperoxidasa; (No de círculos que detectaron la banda de proteína/No de círculos).

CUADRO 21. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE INMUNOTRANSFERENCIA. GRUPO IV. - SUEROS DE CERDOS VACUNADOS CON UNA DOSIS DE PAV-250 Y DESAFIADOS CON LA CEPA ALD-FPC, CONTRA EL ANTIGENO ALD.

PM/kd	DIAS														
	1		5		10		15		20		25		30		
	Muestras		2		3		4		5		6		7		
	Vac	Cen	Vac	Cen	Vac y Des	Cen	Vac y Des	Cen	Vac y Des	Cen	Vac y Des	Cen	Vac y Des	Cen	
200	208 (1/4)		287 (2/4)						290 (3/4)	290 (1/2)			284 (1/4)	284 (1/2)	
			238 (1/4)			259 (1/4)						238 (4/4)		225 (4/4)	
													218 (1/4)	1.2 205 (4/4)	1.2 205 (1/2)
100	153 a 79 (4/4)								188 (1/4)				190 (4/4)		
		144 a 79 (2/2)	150 (2/4)	150 (1/2)					157 (2/4)				175 (1/4)	161 ² (1/4)	
											154 (2/4)			137 (1/4)	137 (1/2)
									144 ² (1/4)						
									132 (3/4)	132 (1/2)					
													130 (2/4)		
									111 (1/4)					127 (3/4)	117 ² (3/4)
													138 (1/4)		
			103 a 59 (3/4)	103 a 59 (2/2)		10 ⁴ a 58 (3/4)									
									102 78 (1/4)						
													100 L 77 (1/4)		

50	62 55 (2/2)	94 (4/4)	71 (4/4)	63 ² (1/6)	75 (2/4)	95 a 50 (2/2)	91 a 61 (1/4) 91 a 75 (3/4)	91 a 61 (2/2) 91 a 50 (1/2)	65 ² (2/4)	92 a 59 (2/4)	66 (1/4)	92 a 54 (2/2)	92 a 78 (1/4)	92 a 52 ² (3/4)	92 a 52 (1.2)	78 (1/2)	61 (1.2)	52 ² (1/2)	50 (1/4)	66 a 46 (1/2)	71 (1/4)	92 a 54 (2/2)	92 a 78 (1/4)	92 a 52 ² (3/4)	92 a 52 (1.2)	52 ² (1/2)	78 (1/2)	61 (1.2)	52 ² (1/2)	50 (1/4)
----	-------------------	-------------	-------------	--------------------------	-------------	---------------------	--	--	--------------------------	---------------------	-------------	---------------------	---------------------	----------------------------------	------------------	-------------	-------------	--------------------------	-------------	---------------------	-------------	---------------------	---------------------	----------------------------------	------------------	--------------------------	-------------	-------------	--------------------------	-------------

										31 32 (1/4)	32 39 (1/2)		48 (1/2)		
										36 39 (1/4)			44 (1/4)		
										39 35 (1/4)	39 35 (1/2)				
										35 27 (1/4)	35 32 (1/2)				
			28a21 (1/4)								32 27 (1/2)		29 23 (3-4)	29-27 (1/2)	
													27 (1/4)	27-23 (1/2)	
20										25 (1/4)					
										25 21 (1/4)			23 (1-4)		
										1 21 (1/4)					
							18 ¹ (2/4)			17 10 (1/4)	17 (1/2)				
										15 11 (1/4)	16 11 (1/2)				
0	Vac pav- 250									1 5 (1/4)					
	Acs I.P.	0/4	0/2	0/4	0/2	0/4	0/2	0/4	0/2	0/4	0/2	0/4	0/2	0/4	0/2

Vac = Vacunados; Des = Desafiados; Vac PAV-250 = Día en que se realizó la vacunación; Desafío con ALD = Día del desafío con la cepa ALD; 1 = proteínas presentes en el gel PAGE; 2 = proteínas reconocidas en la literatura consultada; Acs I.P. = Anticuerpos contra IPI detectados por la técnica de inmunoperoxidasas; (No de cerdos que detectaron la banda de proteína/No de cerdos).

CUADRO 22. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE INMUNOTRANSFERENCIA. GRUPO V. - SUEROS DE LOS CERDOS VACUNADOS CON DOS DOSIS DE LA CEPA PAV-250 Y DESAFIADOS CON LA CEPA ALD-FPC, CONTRA EL ANTIGENO DE LA CEPA VIRULENTE ALD.

PM/KC	DIAS		5		10		15		20		25		30		
	1		2		3		4		5		6		7		
	Vac	Cen	Vac	Cen	Vac y Des	Cen	Vac y Des	Cen	Vac y Des	Cen	Vac y Des	Cen	Vac y Des	Cen	
200									290 (4/4)		² 238 (3/4)		284 (3/4)	284 (1/2)	
											200 (1/4)		^{1,2} 206 (3/4)	223 (1/2) 265 ^{1,2} (1/2)	
100	144 a 89 (4/4)	144 a 89 (2/2)	150 (1/4)		172 (1/4)		158 a 58 (2/4)				157 (2/2)	154 (1/4)		175 (3/4)	
						² 145 a 63 (2/2)					132 (2/2)			² 161 (2/4)	
			113 a 103 (4/4)									² 119 (1/4)	137 (2/4)	137 (2/2)	
			103 a 65 (4/4)	103 a 59 (2/2)					111 (1/4)				117 (2/4)	117 (2/2)	

50			¹ 94 a 65 (1/2)	¹ 88 a 69 (2/4)	¹ 91 a 50 (2/4)	¹ 91 a 50 (2/2)	² 85 (2/4)	² 92 a 59 (2/4)	² 92 a 59 (1 2)	¹ 99 a 56 (2 4)	¹ 99a56 (2 2)
20			² 30 a 25 (1/4)	^{1 2} 68 a 55 (1/4)	^{1 2} 68 a 72 (1/4)	^{1 2} 66 (1/4)	^{1 2} 60 a 42 (2/4)	^{1 2} 60 a 42 (1/2)	^{1 2} 59 (1/4)	^{1 2} 48 46 (1/4)	^{1 2} 48 46 (1/4)
				^{1 2} 23 a 20 (1/4)	^{1 2} 23 a 17 (1 4)	^{1 2} 20 20 (1/4)	^{1 2} 27 27 (1/4)	^{1 2} 27 23 (1/2)	^{1 2} 23 23 (1/2)	^{1 2} 29 a 23 (3/4)	^{1 2} 29a23 (2/2)

							13 ^a (1/4)		17 a 11 (1/4)	17 (1/2)				
	Vec PAV- 250				2 ^a Vec PAV- 250 y Desaf to con ALD				16 a 11 (2/4)	16 a 11 (1/2)				
0									15 a 11 (1/4)	15 a 10 (1/2)				
Acs I.P.	0/4	0/2	0/4	0/2	0/4	0/2	2/4	0/2	3/4	0/2	4/4	0/2	4/4	0/2

Vec PAV-250 = Día en que se realizó la vacunación ; 2^a. Vacunación con la PAV-250 y día del desafío con la cepa ALD; Des = Desafiados; 1 = proteínas presentes en el gel PAGE ; 2 = proteínas reconocidas en la literatura consultada; Acs I.P. = Anticuerpos contra FPC detectados por la técnica de inmunoperoxidasz; (No de cerdos que detectaron la banda de proteínas/ No de cerdos).

CUADRO 23.- PRUEBAS DE INMUNOTRANSFERENCIA :
 PROTEÍNAS DETECTADAS POR LOS SUEROS DE LOS GRUPOS (II,
 III, IV Y V) ANTE LOS ANTÍGENOS PAV-250 Y ALD DE FPC.

DÍAS SANG	GRUPO II (VACUNADO)				GRUPO III (INOCULADO)				GRUPO IV (VAC1/ INOC)				GRUPO V (VAC2/ INOC)			
	P A V	C E N	A L D	C E N	P A V	C E N	A L D	C E N	P A V	C E N	A L D	C E N	P A V	C E N	A L D	C E N
DÍA 15	87	87					61	61			61	61				
			41	41			41				50	50				
													31			
DÍA 20	135							169								35
	85		85	85	99				99		85	85	99		85	
							78	78			50				78	
							50								50	
			39								39	39			42	
			35	35			35	35			35	35			39	
			32				32	32			32	32			35	
															32	
DÍA 25	98		238						98	96	238				238	
			77								77					
			65	65			65	65			50					
DÍA 30	99	99	206	206			206	206	99	99	206	206	99	99	206	206
			99	99			99	99			78	78			99	99
											61	61			78	78
											52	52			61	61
			39								48				48	48
			38	38												

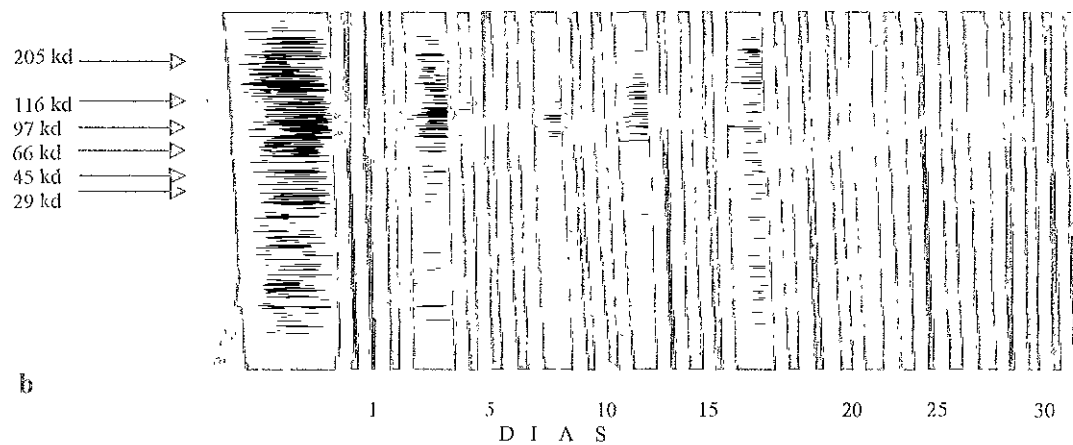
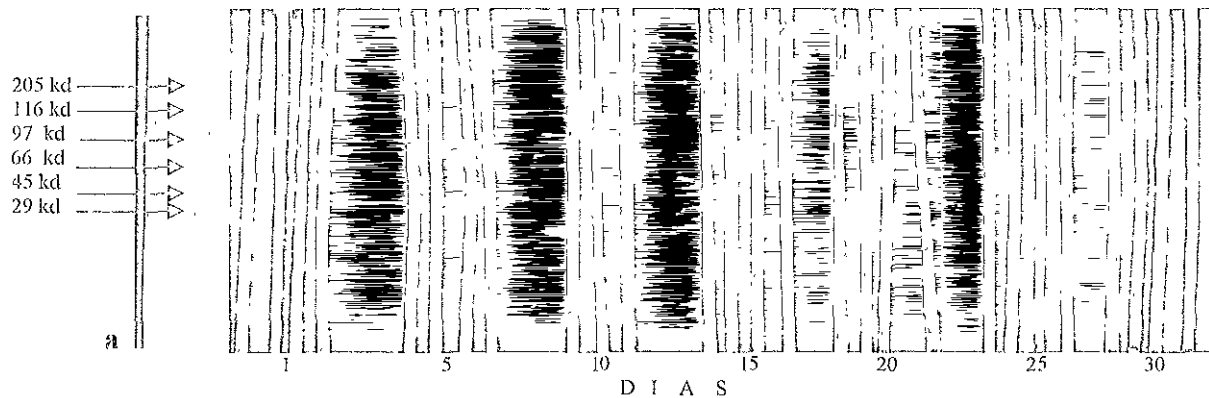
DÍAS SANG = Días de la toma de sangre para suero sanguíneo, PAV = cepa PAV-250,
 ALD = cepa patógena ALD, CEN = centinecias.

CUADRO 24.- PRUEBAS DE INMUNOTRANSFERENCIA :
 PROTEÍNAS DIFERENTES DETECTADAS POR LOS
 SUEROS DE LOS GRUPOS, ANTE EL Ag-PAV-250 Y ALD.

PM	Ag-PAV-250	Ag-ALD
200		238****
		206*****
100	169*	
	135*	
50		78*****
		77**
		55**
		61**
		52**
		50*****
30		41*
		39*****
		35****
		32**

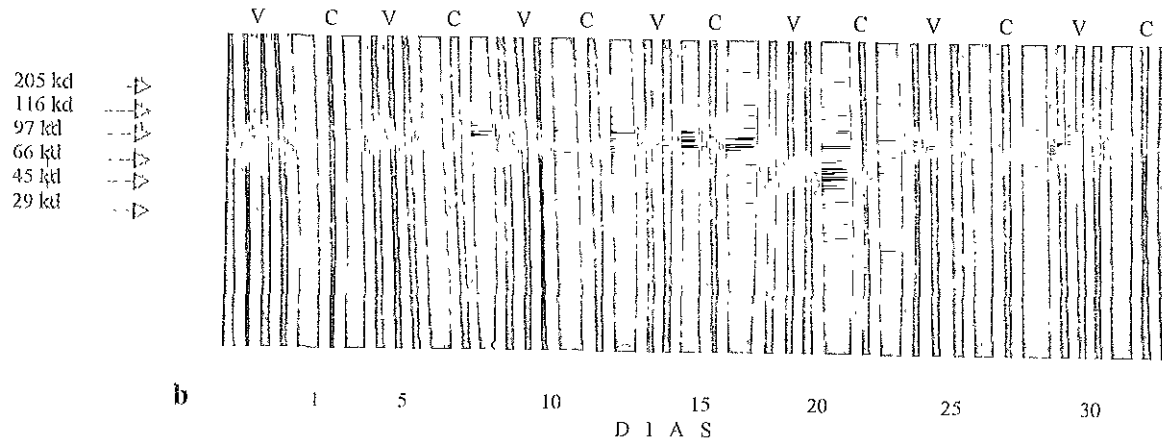
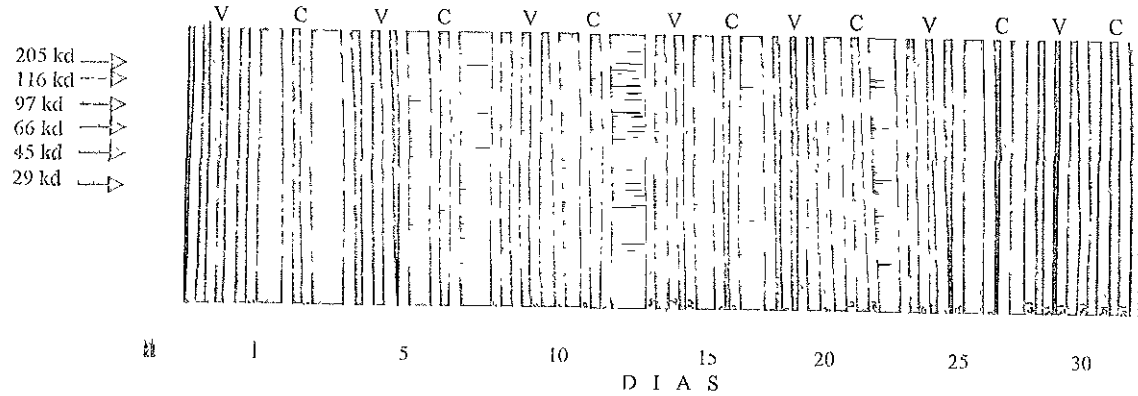
o = Frecuencia con que se detectó

FIGURA 12.- RESULTADO DE LAS PRUEBAS DE INMUTRANSFERENCIA
GRUPO I.- CERDOS CONTROLES NEGATIVOS



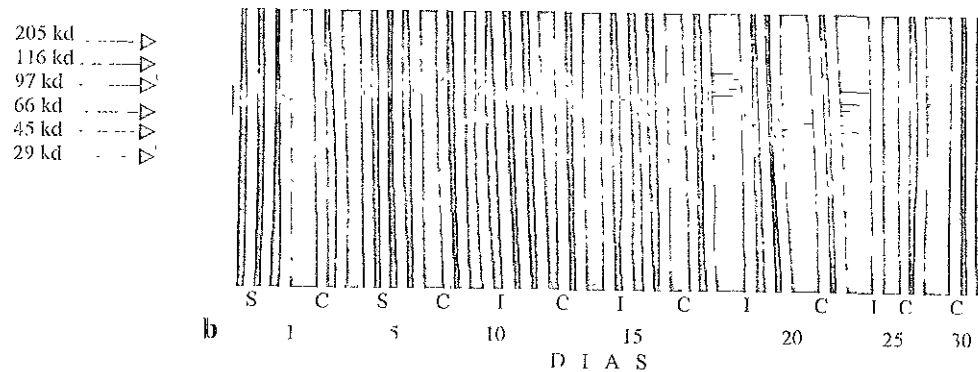
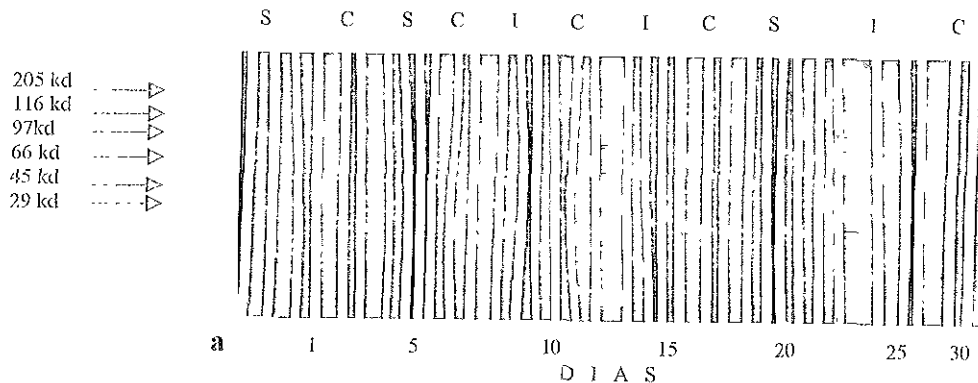
a = sueros de los cerdos contra la cepa pav-250; b = sueros contra las cepas patógena AI,D, DIAS = de la toma de sueros sanguíneos

FIGURA 13.- GRUPO II, CERDOS VACUNADOS CON UNA DOSIS DE PAV-250



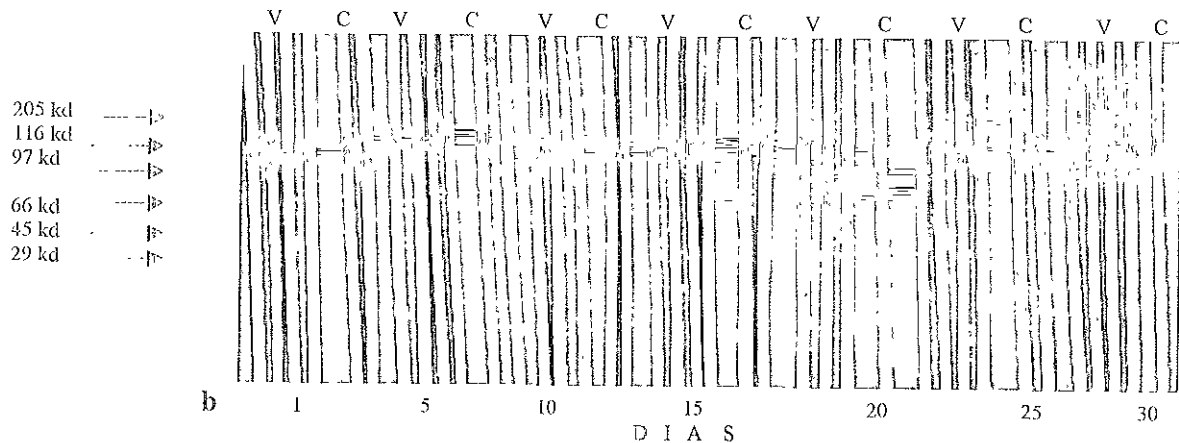
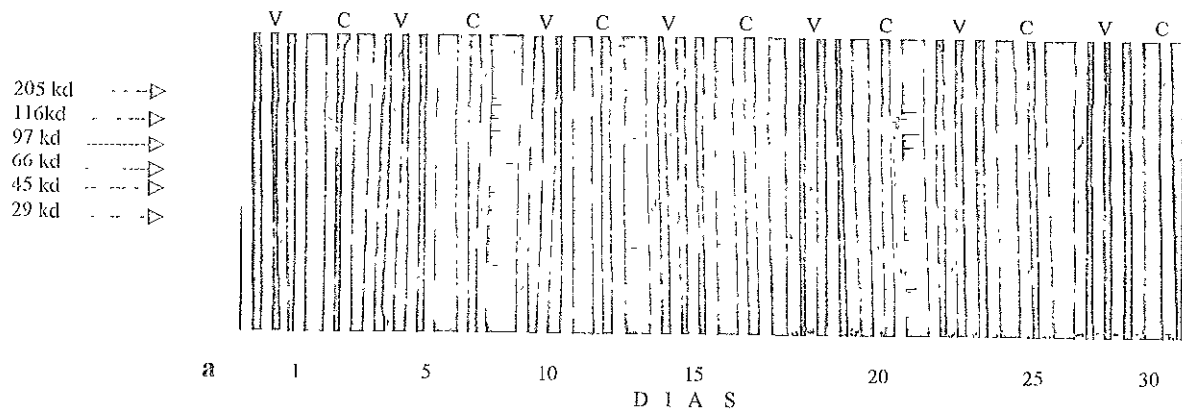
a = sueros de los cerdos contra la cepa PAV-250, b = sueros contra la cepa patógena ALD,
DIAS - días de la toma del suero, V= cerdos vacunados, C=cerdos centinelas

FIGURA 14.- GRUPO III, CERDOS INOCULADOS CON LA CEPA PATOGENA ALD-FPC



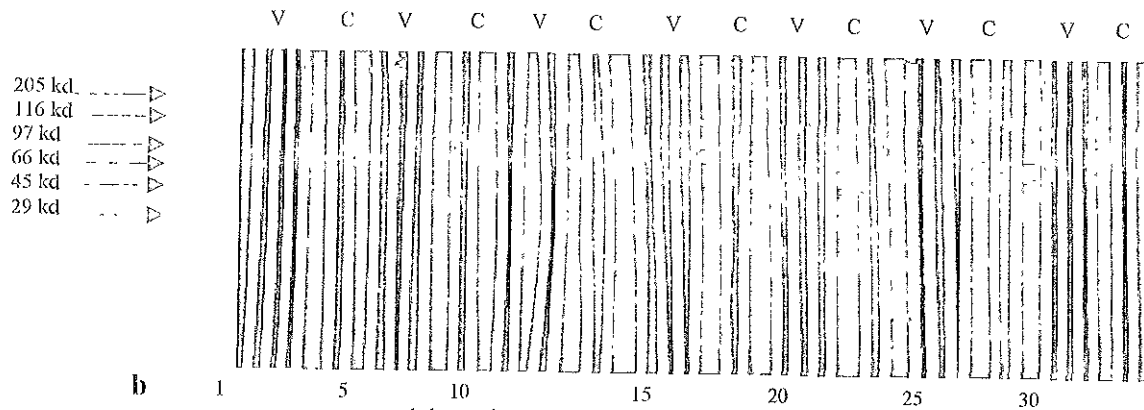
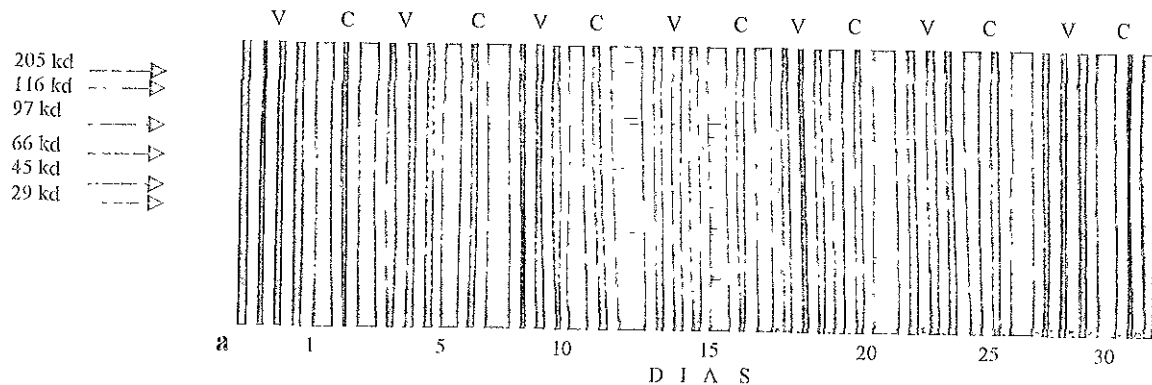
a = sueros de los cerdos contra la cepa PAV-250, b = sueros contra la cepa patógena ALD,
DIAS = días de la toma del suero; S= cerdos susceptibles; C = cerdos centinelas, I = cerdos inoculados

FIGURA 15.- GRUPO IV, CERDOS VACUNADOS CON UNA DOSIS DE LA CEPA PAV-250
E INOCULADOS CON LA CEPA ALD-FPC



a = sueros de los cerdos contra la cepa PAV-250; b = sueros contra la cepa patógena ALD;
DIAS = días de la toma del suero; V= cerdos vacunados; C=cerdos centinelas

FIGURA 16.- GRUPO V, CERDOS VACUNADOS CON DOS DOSIS DE LA CEPA PAV-250
E INOCULADO CON LA CEPA ALD-FPC



a = sueros de los cerdos contra la cepa PAV-250, b = sueros contra la cepa patógena ALD;
DIAS - días de la toma del suero, V= cerdos vacunados, C=cerdos centinelas

REFERENCIAS.

- 1.- Aceveco J J. 1998 Dirección General de Salud Animal (D G S.A)
- 2 - Bommeli, 1997 Chekit CSF-SERC, for the diagnosis of classical swine fever. Pp 1-23.
- 3.- Bradford M.N 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microquantities of protein. *Anal Biochem* 72, pp 248
- 4.- Bruschke C.J., Hulst M.M., Moorman R. J., van Rijn P.A., Van Oirschot J.T 1997. Glycoprotein Ems de Pestivirus induces apoptosis in lymphocytes of several species *Journal of Virology*. 71 (9) : 6692-6696.
- 5 - Carbrej E.A 1988. Diagnostic Procedures. In : *Classical Swine Fever and Related Viral Infections*. Edited B. Liess. Institut für Virologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover. Hannover, Federal Republic of Germany. Martinus Nijhoff Publishing. Boston
- 6.- Coba A., MA., Correa G.,P. 1993 Diagnóstico de Fiebre Porcina Clásica (FPC) por la técnica directa de inmunofluorescencia Folleto, Proyecto Fiebre Porcina Clásica, Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, CENID-Microbiología. Pp 1-23.
- 7 - Coba A, MA., Correa G, P 1995. Comunicación personal. Proyecto Fiebre Porcina Clásica, CENID-M, INIFAP, SAGAR .
- 8.- Correa G , P., Coba A., MA., Anaya E., AM. 1995 Investigaciones realizadas en México con la vacuna PAV-250 de virus vivo atenuado contra la fiebre porcina clásica (FPC). *Academia Veterinaria Mexicana, A.C* Pp. 38-45.
- 9.- Correa G.P 1998. Características más importantes de la vacuna PAV-250 y de las vacunas contra la Fiebre Porcina Clásica usadas en México. *La Fiebre Porcina Clásica en las Américas. Simposium Internacional Puebla-1998*. Editado por Antonio Morilla González. Pp 301-323
- 10 - Dahle J. and Liess B 1992. A review on classical swine fever infections in pigs : Epizootiology, clinical disease and pathology. *Comp. Immun Microbiol Infect Dis.* Vol. 15, No. 3. pp 203-211.
- 11.- Ehrensperger. 1988. Immunological aspects of the infection. *In* : *Classical Swine Fever and Related Viral Infections* Ed. B Liess. Institut für Virologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover Hannover, Federal Republic of Germany. Martinus Nijhoff Publishing Boston Pp 143-163

12 - Eibers Knut, Norbet Tantz, Paul Becher, Dieter Stoll, Tillman Rürmenapf, and Heinz-Jurgen Thiel. 1996. Processing in the Pestivirus E2-NS2 region : Identification of proteins p7 and E2p7 Journal of Virology Pp 4131-4135

13 - Enzmann P. J 1988. Molecular Biology of the Virus *In* : Classical Swine Fever and Related Viral Infections Edited B. Liess. Institut für Virologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover. Hannover, Federal Republic of Germany. Martinus Nijhoff Publishing. Boston. Pp 81-98

14.- Escribano J. M., Pastor M. J., Arias M., Sánchez-Vizcaíno J.M. 1990. Confirmación de sueros positivos a ELISA- peste porcina africana mediante la técnica de "immunoblotting" Utilización de las proteínas inducidas por el virus, con pesos moleculares comprendidos entre 23 y 35 kilodaltons, en el desarrollo de un "kit" de diagnóstico. Med. Vet. Vol. 7, No. 3. Pp. 135-141.

15.- Estrada S. E., Gonzalez-Vega D., Arriaga E., Avila S. E., Hernández A. Y Morrilla A. 1998. Risk factors that may increase the number of outbreaks of Classical Swine Fever in the control area of Mexico. OIE Symposium on Classical Swine Fever (Hog Cholera). Birmingham (United Kingdom), 9-10 July, p 19.

16.- Fenner Frank J., E Paul J. Gibbs, Frederick A. Murphy, Rudolf Rott, Michael J. Studdert y David O. White. 1993. Replication. *In* : Veterinary Virology. Second Edition Academic Press, Inc. Pp 39-65.

17.- Gómez-Tejedor, Ortiz y M. Valenciano Martínez-Orozco. 1994. Epizootiología y patogenia de la Peste Porcina Clásica. Fichero Porci. No.22, Julio, pp 11-17

18.- González Silva Carlos. 2000. Prevención de la transmisión vía respiratoria del virus de la Fiebre Porcina Clásica mediante la vacunación con la "cepa" PAV-250. Tesis. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. Pp 4-77.

19 - Greiser- Wilke I., V. Moennig, C O Z Coulibaly, J. Dahle, L. Leder, and B. Liess. 1990 Identification of conserved epitopes on a hog cholera virus protein. Arch Virol 111: 213-225

20.- Greiser-Wilke I., K. E. Dittmar, B. Liess and V. Moennig. 1992. Heterogeneous expression of the non-structural protein p80/p125 in cells infected with different pestiviruses. Journal of General Virology, 73 : 47-52.

21 - Hitchcock P, Brown T. 1983 Morphological heterogeneity among Salmonella lipopolysaccharide chemotypes in silver stained polyacrylamide gels. Journal of Bacteriology 154 (1) : 269-277

22.- Horsinek M. C. 1991 Pestivirus – taxonomic perspectives. *In* : Ruminant Pestivirus Infections Virology, Pathogenesis and Perspectives of Prophylaxis. Archives of Virology. Supplementum 3. Springer – Verlag Wien New York. Pp. 1-5.

- 23.- Huist, M. M., D.E. Westra, G. Wensvoort, and R. J. M. Moormann. 1995. Glycoprotein E1 of Hog Cholera Virus Expressed in Insect Cells Protects Swine from Hog Cholera. *Journal of Virology*, Sept. Pp. 5435-5442.
- 24.- Huist Marcel & Rob J.M. Moormann. 1996. Classical swine fever virus diagnostics and vaccine production in insect cells. *Cytotechnology* 20: 271-279
- 25.- Huist M.M., Panoto F.E., Hoekman A., van Gennip H.G., Moormann R.J. 1998. Inactivation of the RNase activity of glycoprotein E(rns) of classical swine fever virus in a cytopathogenic virus. *Journal of Virology* 72 (1): 151-7.
- 26.- Kassimi L, Bakkali, Gonzague M., Boutrovillie A., Cruclere C. 1996. Expression and characterization of part of hog cholera virus non-structural proteins. *Zentralblatt Fur Veterinarmedizin-Reihe B*. 43(3): 167-77.
- 27.- Koning M., Lengersfeld T., Pauly T., Stark R., Thiel H-J. 1995. Classical swine fever virus : independent induction of protective immunity by two structural glycoproteins. *Journal of Virology*. 69 (10) : 6479-6486.
- 28.- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature, London* 227:680.
- 29.- Maddy Van Zijl, Gert Wensvoort, Eric de Kluyver, Marcel Huist, Hanneke van der Gulden, Arno Gielkens, Anton Bems, and Rob Moormann. 1991. Live Attenuated Pseudorabies Virus Expressing Envelope Glycoprotein E1 of Hog Cholera Virus Protects Swine against both Pseudorabies and Hog Cholera. *Journal of Virology*. Pp 2761-2765.
- 30.- Méndez Trigo Alicia. 1999. Bayovac CSF Marker. Vacuna Inactivada E2 de subunidad contra el virus de la Fiebre Porcina Clásica. Biological Regulatory Affairs, Lenexa, Kansas, USA. Bayer.
- 31.- Mendoza Susana Elvira. 1995. Fiebre Porcina Clásica : Investigación actual y perspectivas de un desarrollo tecnológico aplicado al diagnóstico serológico. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias (Área Microbiología). UNAM, FES- Cuautitlán. Pp 1-191.
- 32.- Meyers Gregor, Heinz-Jurgen Thiel. 1995. Cytopathogenicity of Classical Swine Fever Virus Caused by Defective Interfering Particles. *Journal of Virology*. Pp. 3683-3689
- 33.- Meyers Gregor, Heinz-Jurgen Thiel, and Tillmann Rämgenapf. 1996. Classical Swine Fever Virus : Recovery of Infectious Viruses from cDNA Constructs and Generation of Recombinant Cytopathogenic Defective Interfering Particles. *Journal of Virology*, Mar Pp 1588-1595.
- 34.- Meyers Gregor and Heinz-Jurgen Thiel. 1996. Molecular characterization of Pestivirus. *Advances in virus Research*, Vol. 47. Pp 53-115.

- 35.- Miorad Susa, Mathias Koning, Armin Szalmuller, Matthias J. Reddehase, and Heinz-Jurgen Thiel. 1992. Pathogenesis of Classical Swine Fever B-Lymphocyte Deficiency Caused by Hog Cholera virus. *Journal of Virology*. Pp. 1171-1175.
- 36.- Moennig V. 1988. Characteristics of the virus *In*: Classical Swine Fever and Related Viral Infections. Edited B. Liess. Institut für Virologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover Hannover, Federal Republic of Germany Pp. 55-80
- 37.- Moennig V. 1992. The Hog Cholera Virus. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis* Vol 15, No 3, pp 189-201
- 38.- Moormann J.M. Rob., Petra A.M. Warmerdam, Bert Van Der Meer, Wim M. M. Schaaper, Geri Wensvoort, and Maral M. Hulst. 1990 Molecular cloning and Nucleotide Sequence of Hog cholera Virus Strain Brescia and Mapping of the Genomic region Encoding Envelope Protein E1. *Virology* 177, 184-198.
- 39 - Morilla Gónzales Antonio. 1997. Manual para el control de las enfermedades infecciosas de los cerdos. Pp. 91
- 40.- Murphy, FA, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, S.A. Ghabrial, A.W. Jarvis, G.P. Martelli, M.A. Mayo, M.D. Summers. 1995. Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Virology Division International Union Microbiological Societies* Pp 415-424.
- 41- Muyldermans G, A Caij, A. De Smet, F. Koenen, and R. Hamers. 1993. Characterization of structural and non-structural proteins of hog cholera virus by means of monoclonal antibodies. *Arch. Virol.* 131: 405-417.
- 42 - Pauly T., M. Koning, H.J. Thiel and A. Szalmuller. 1998. Infection with classical swine fever virus : effects on phenotype and immune responsiveness of porcine T lymphocytes *Journal of General Virology*, 79, 31-40.
- 43.- Porcillus Pesti. Proyecto de instructivo. Intervet México S.A de C V.
- 44 - Ramírez L.R , Cuerrero A , Macías G.M., De la O.R.F., González S. C. y Deigadillo A. J.B. 1998. Prueba de inmunoperoxidasa para detección de anticuerpos contra el virus de la Fiebre Porcina Clásica (FPC). *In*: Diagnóstico de Fiebre Porcina Clásica. Técnicas de Laboratorio. Simposium Internacional de Fiebre Porcina Clásica. Puebla, Puebla/Tecamac, Estado de México, 30 de noviembre, 1 y 2 de diciembre Pp. 8-11.
- 45.- Roehle P M And M. J. Woodward. 1991. Polymerase chain reaction amplification of segments of pestivirus genomes. *Arch. Virol.* (Suppl. 3). 231-238.
- 46 - Roizman Bernard and Peter Palese. 1996 Multiplication of viruses : An Over View. *In* *Virology*, Vol 1. Third Edition. Ed. Bernard N. Fields, David M. Knipe, Peter M. Howley. Lippincott-Raven Publishers. Pp. 101-111.

- 47.- Romero L., Marisa A., C. Gomez-Tejedor, Montserrat A., y Sánchez-Vizcaino 1994. Diagnóstico Laboratorial de la Peste Porcina Clásica. INIA. Centro de investigación en Sanidad Animal (CISA). Notas del Curso de Sanidad Animal: Aplicación de la Biotecnología al Diagnóstico y Programas de Erradicación de Enfermedades Infecciosas. Centro Iberoamericano de Formación de la Agencia Española de Cooperación Internacional. Pp 1-12.
- 48.- Rüménapf T., G Meyers, R. Stark and H.J. Thiel. 1991. Molecular characterization of hog cholera virus: *In* : *Ruminal Pestivirus Infections. Virology, pathogenesis and Perspectives of Prophylaxis Archives of Virology. Supplementum 3. Springer-Verlag Wien New York. Pp 7-18.*
- 49.- Rüménapf Thilman, Robert Stark, Gregor Meyers, and Heinz-Jurgen Thiel 1991. Structural Proteins of Hog Cholera virus expressed by vaccinia virus : Further characterization and induction of Protective immunity. *Journal of Virology*, Feb. Pp 589-597.
- 50.- Rüménapf Thilman, Gabi Unger, James H. Stranss and Heinz-Jurgen Thiel. 1993. Processing of the Envelope Glycoproteins of Pestiviruses. *Journal of Virology*. Pp 3288-3294.
- 51.- Sandvik Torstein 1997. Studies on diagnosis of pestivirus infections in cattle. Thesis for the degree of Doctor Scientiarum. National Veterinary Institute. Oslo-Norway. Pp. 3-59.
- 52.- Sierra M.A., J. Martín de las Mulas, C. Sánchez y M. Quezada. 1994. Características clínicas y anatomopatológicas de la Peste Porcina Clásica. *Fichero Porci*. No 22, Julio. Pp. 19-26.
- 53.- Stark Robert, Gregor Meyers, Thilman Rüménapf, and Heinz-Jurgen Thiel. 1993. Processing of Pestivirus Polyprotein : Cleavage Site between Autoprotease and Nucleocapsid Protein of Classical Swine Fever Virus. *Journal of Virology*. Pp. 7088-7095.
- 54.- Terpstra C 1991. Hog Cholera : An update of present knowledge: *British Veterinary Journal*, 147. Pp. 397-406.
- 55.- Thiel Heinz-Jurgen, Robert Stark, Emille Weiland, Thilman Rüménapf and Gregor Meyers. 1991. Hog Cholera Virus : Molecular Composition of Virions from a Pestivirus *Journal of Virology*. Pp. 4705-4712.
- 56.- Thiel H-J., Robert Stark, Gregor Meyers, Emille Weiland and Thilman Rüménapf. 1992. Proteins encoded in the 5' region of the pestivirus genome - considerations concerning taxonomy. *Veterinary Microbiology*, 33. Pp. 213-219.
- 57.- Thiel Heinz-Jurgen, Peter G.W., Piagenann, Volker Mcennig. 1996. *Pestivirus In. Virology. Vol. 1 Third Edition. Ed. Bernard N Fields, D.M. Knipe, P. M. Howley. Lippincott, Raven Publishers, Philadelphia.*

- 58 - Towbin H. H., Staehelin T., Gordon J 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. *Proceedings of National Academy of Immunopathology* 16, 26-36
- 59.- Van Oirschot J T 1988. Description of the virus infection. *In* : *Classical Swine Fever and Related Viral Infections*. Ed: B Liess Martinus Nijhoff Publishing Boston/Dordrecht/Laicester Pp.1-25.
- 60.- Van Oirschot J T. And C. Terpstra. 1989 Hog Cholera Virus. *In* : *Virus infections of porcines*. Ed. M.B. Pensaert Elsevier,
- 61.- Van Oirschot J.T. 1992. Hog Cholera. *In* : *Diseases of Swine* Ed: Allen D. Leman, Barbara E Straw, William L. Mengeling, Sylvie D'Allaire, David J Taylor 7th Edition. Iowa, State University Press / Ames, Iowa, USA. Pp. 274-285.
- 62 - Van Oirschot J T. 1999. Classical Swine Fever (Hog Cholera). *In* *Diseases of Swine*. Ed: Allen D Leman, Barbara E. Straw, Sylvie D'Allaire, William L. Mengeling, David J. Taylor 8th Edition Iowa, State University Press / Ames, Iowa, USA. Pp. 159-172
- 63 - Vannier, P ; Y Leforban; R Camero, R Cariolet 1988. Contamination of a live virus vaccine against pseudorabies (Aujeszky's disease), by an ovine pestivirus pathogenic for the pig. *Annales de Recherches Veterinaires*, 19:4, 283-290.
- 64.- Weiland Emilie, Robert Stark, Bernd Hazz, Tillmann Rumenapf, Gregor Meyers and Heinz-Jurgen Thiel. 1990 Pestivirus Glycoprotein which Induces Neutralizing Antibodies form a Part of a Disulfide-Linked Heterodimer. *Journal of Virology* Pp. 3563-3569
- 65 - Weiland Emilie, Reinhard Ahl, Robert Stark, Frank Weiland and Heinz-Jurgen Thiel. 1992. A second Envelope Glycoprotein Mediates Neutralization of a Pestivirus, Hog Cholera Virus. *Journal of Virology*, p. 3677-3682
- 66.- Wensvoort, G.; C. Terpstra . 1988. Bovine viral diarrhoea virus infection in piglets born to sows vaccinated against swine fever with contaminated vaccine. *Research in Veterinary Science*, 45:2. Pp. 143-148.
- 67.- Wensvoort G, J. Boonstra and B. G. Boelzinga. 1990. Immunoaffinity purification and characterization of the envelope protein E1 of hog cholera virus. *Journal of General Virology*, 71 pp 531-540
- 68 - Westergaard, J M. 1996. Attitude of the European Community to Vaccines. *Acta Vet Scand. Suppl* 90, pp 73-81.
- 69 - Windisch Jorg M., Rainer Schneider, Robert Stark, Emilie Weiland, Gregor Meyers, and Heinz-Jurgen Thiel 1996 Rnase of Classical Swine Fever Virus. *Biochemical Journal of Virology*, Vol 70, No. 1 pp 352-358