

11661  
5



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN

ESTUDIO DE PROTEÍNAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE PORCINA  
CLÁSICA (VPPC) E INMUNOTRANSFERENCIA CON  
ANTICUERPOS DE CERDOS VACUNADOS E INFECTADOS  
EXPERIMENTALMENTE

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA  
P R E S E N T A :  
Q. F. B. OSCAR TORRES ANGELES

DIRECTORES: DRA. SUSANA ELISA MENDOZA ELVIRA

DR. JOSE ABEL CIPRIAN CARRASCO

ASESORES

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

M. EN C. EDGAR AGUILERA CERON

DR. ELISEO HERNÁNDEZ BAUMGARTEN

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

2002

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



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.

## **Agradecimientos**

A mis padres Miguel Torres García y Simona Angeles Barreara por todos sus consejos, cariño y estímulo para continuar no solo en los estudios sino también en la vida.

A las familias Torres Franco, Hernández Torres, Torres Solórzano, Vargas Torres, Ruiz Torres y Candelario Torres por su apoyo y cariño.

Al MVZ Horacio Lara Puente y los señores Martín Cruz Sosa y Esteban García García por su apoyo en la realización del presente trabajo.

A la M. en C. Carolina Moreno Ramos por su amistad y apoyo.

A mis asesores Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira, Dr. Abel Cirpián Carrasco, MVZ, MA Pablo Correa Girón, M. en C. Edgar Aguilera Ceron y al Dr. Eliseo Hernández Baumgarten por su tiempo y dedicación para la realización de este trabajo.

Al Dr. Álvaro Aguilar Setién por sus consejos para la redacción del presente trabajo.

Al Dr. Víctor Zendejas Buitrón por su amistad y sugerencias.

A todas las personas que de una u otra forma me apoyaron en mis estudios y en la realización del presente trabajo.

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del CENID-Microbiología INIFAP, SAGARPA y en el Laboratorio de Virología de la Coordinación de Estudios de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM con el apoyo financiero del Proyecto CONACYT No. 1082-PB.

## INDICE

	Página
1.0 Generalidades.....	1
1.1 La Fiebre Porcina Clásica (Cólera Porcino) historia y distribución mundial .....	2
1.2 La FPC en México .....	2
1.3 Agente etiológico .....	8
1.4. Propiedades vírales .....	12
1.5. Epizootiología y transmisión .....	14
1.5.1 Transmisión natural .....	17
1.5.2 Cerdas portadoras del virus .....	17
1.5.3 Movilización de animales .....	18
1.5.4 Papel del cerdo y sus subproductos .....	18
1.5.5 Trasmisión mecánica por el hombre .....	19
1.5.6 Trasmisión por vectores (artrópodos) .....	19
1.6 Patogenia y manifestaciones clínicas .....	19
1.6.1 Infección aguda .....	20
1.6.2 Infección persistente .....	26
1.6.3 Infección congénita .....	29
1.7. Diagnóstico de laboratorio .....	30
1.7.1 Diagnóstico diferencial e integral .....	31
1.7.2 Demostración del virus o del antígeno viral .....	32
1.7.3 Detección de anticuerpos .....	34
1.7.3.1 Reacción inmunitaria .....	34
1.8 Profilaxis y control .....	36
1.9 Vacunas .....	46
1.9.1 "Cepas" vacunales permitidas en México .....	46
2.0 Justificación .....	50
3.0 Objetivo general .....	51
3.0.1 Objetivos particulares .....	52
4.0. Materiales y métodos .....	53
4.1 Virus de la Fiebre Porcina Clásica .....	53
4.2. Determinación de la dosis inmunizante del virus de campo VC-89-126 productora de un período de incubación y de un curso largo de la enfermedad .....	53
4.3 Formación de los grupos experimentales y los tratamientos empleados .....	54
4.4 Serología .....	56
4.5 Cuantificación de proteínas .....	56
4.6 Comparación del patrón electroforético de los virus estudiados .....	57
4.7 Electrotransferencias .....	59
4.8 Tablero de Ajedrez .....	59
4.9 Inmunotransferencias .....	60
4.10 Detección de glicoproteínas .....	61
4.11 Detección de anticuerpos contra <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> y <i>Pasteurella multocida</i> .....	61

4.12 Detección de anticuerpos contra el Virus de Diarrea Viral Bovina (VDVB) y contra Virus de la Enfermedad de la Frontera contra (VBD) .....	62
5.0 Resultados .....	63
5.1 Virus de la FPC .....	63
5.2 Determinación de la dosis mínima infectante productora de un período de incubación y curso largo del virus de campo VC-89-126 de FPC .....	63
5.3 Signología .....	63
5.4 Hallazgos a la necropsia .....	68
5.5. Detección de anticuerpos contra <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> y <i>Pasteurella multocida</i> . .....	70
5.6. Cuantificación de proteínas .....	72
5.7. Patrón electrofóretico de las cepas .....	73
5.8. Electrotransferencias .....	76
5.9. Tablero de ajedrez .....	77
5.10. Inmunotransferencias .....	77
5.11 Detección de glicoproteínas .....	99
5.12 Detección de antígenos de las VDB y VDVB .....	99
6.0. Discusión .....	100
7.0. Conclusiones .....	105
8.0. Bibliografía .....	106

## ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1.- En el que se muestra la situación zoonositaria de los diferentes Estados del País hasta el 2 de mayo del 2000 .....	6
Cuadro 2.- Vacunas que fueron empleadas para el control de la FPC ....	46
Cuadro 3.- Calendario para determinar la dosis inmunizante no letal del virus patógeno VC-89-126 de FPC .....	54
Cuadro 4.- Distribución de los grupos experimentales y los tratamientos (vacunados, desafiados o sin tratamiento) que recibieron .....	56
Cuadro 5.- Signos clínicos observados en los grupos experimentales .....	67
Cuadro 6.- Lesiones macroscópicas observadas a la necropsia de los cerdos de los grupos experimentales .....	70
Cuadro 7.- Resultados de la serología de los grupos experimentales .....	71
Cuadro 8.- Proteínas del virus de la FPC reportadas en la literatura y presentes en las "cepas" PAV-250 y VC-89-126 .....	75
Cuadro 9.- Respuesta serológica de los cerdos del grupo A, que sólo recibieron desafío con la "cepa" de campo ante la prueba de inmunotransferencia empleando como antígenos las cepas vírales de campo VC-89-126 y la vacunal PAV-250. ....	78
Cuadro 10.- Respuesta serológica de los cerdos del grupo B que recibieron 2 vacunaciones y desafío con la "cepa" de campo ante la prueba de inmunotransferencia, empleando como antígenos la cepa víral de campo VC-89-126 y la vacunal PAV-250 .....	82
Cuadro 11.- Respuesta serológica de los cerdos del grupo C que recibieron una dosis de vacuna y desafío ante la "cepa" de campo ante la prueba de inmunotransferencia, empleando como antígenos la cepa víral de campo VC-89-126 y la vacunal .....	87
Cuadro 12.- Respuesta serológica de los cerdos del grupo D que no recibieron ningún tratamiento ante la prueba de inmunotransferencia empleando como antígenos la cepa víral de campo VC-89-126 y la vacunal PAV-250 .....	92
Cuadro 13.- Respuesta serológica de los cerdos del grupo E que solo recibieron dos dosis de vacuna PAV-250 ante la prueba de inmunotransferencia, empleando como antígenos la cepa víral de campo VC-89-126 y la vacunal PAV-250. ....	95

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1.- Situación zoonositaria de la Campaña Contra la Fiebre Porcina Clásica en México hasta mayo de 2000 .....	7
Figura 2.- Organización del genoma de los pestivirus .....	10
Figura 3- Patrón electroforético del virus de campo VC-89-126, el lisado de células PK-15 con suero fetal bovino y la cepa vacunal PAV-250 teñido con la técnica de nitrato de plata .....	74
Figura 4- Inmunotransferencias de los sueros de los animales del grupo A enfrentados al antígeno de campo VC-89-126 y la cepa vacunal PAV-250.	81
Figura 5- Inmunotransferencias de los sueros de los animales del grupo B enfrentados al antígeno de campo VC-89-126 y la cepa vacunal PAV-250.	86
Figura 6- Inmunotransferencias de los sueros de los animales del grupo C enfrentados al antígeno de campo VC-89-126 y la cepa vacunal PAV-250.	91
Figura 7- Inmunotransferencias de los sueros de los animales del grupo D enfrentados al antígeno de campo VC-89-126 y la cepa vacunal PAV-250	94
Figura 8- Inmunotransferencias de los sueros de los animales del grupo E enfrentados al antígeno de campo VC-89-126 y la cepa vacunal PAV-250.	98
Figura 9- Inmunotransferencias de los sueros: positivo al virus de Diarrea Viral Bovina (VDVB+) negativo al virus de Diarrea Viral Bovina (VDVB-), positivo al virus de la Enfermedad de la Frontera (VDB+) y Concanavalina A peroxidada (Con A) enfrentados al antígeno de campo VC-89-126 (A) y la cepa vacunal PAV-250 (B) .....	99

## INDICE DE GRÁFICAS

	Página
Gráfica 1.- Curva estándar de proteínas .....	72
Gráfica 2.- Curva estándar de pesos moleculares para el patrón electroforético y la prueba de inmunotransferencia .....	74



## Abreviaturas

VFPC	=	Virus de la Fiebre Porcina Clásica
FPC	=	Fiebre Porcina Clásica
VDVB	=	Virus de la Diarrea Viral Bovina
VBD	=	Virus de la Enfermedad de la Frontera
<i>A. pleuropneumoniae</i>	=	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
<i>P. multocida</i>	=	<i>Patseurella multocida</i>
ORF	=	Marco de Lectura Abierto
RNA	=	Acido Ribonucleico
pH	=	Potencial de Hidrógeno
DICC <sub>50</sub>	=	Dosis Infectante de Cultivo Celular
IP	=	Técnica de Inmunoperoxidaza
μg	=	Microgramos
μl	=	Microlitros
kd	=	Kilo Daltons

## Resumen.

La fiebre porcina clásica es una enfermedad viral que ocasiona grandes pérdidas a la industria porcícola. En la literatura se ha reportado la presencia de "cepas" de virulencia variable desde las de alta virulencia, hasta las "cepas" de baja virulencia. Las "cepas" de alta virulencia provocan la muerte de los animales sin permitirles desarrollar una respuesta inmunitaria en contra del agente infeccioso. En el presente trabajo se planteó el establecer el patrón electroforético de la "cepa" de alta virulencia de campo VC-89-126 y de la vacunal PAV-250, para determinar si se presentan proteínas que pudieran ser diferentes entre ambos virus; para lo cual se requería contra con suero inmune contra estas dos "cepas".

Se realizó un experimento mediante el cual se logró infectar a cerdos susceptibles con diluciones de una cepa de alta virulencia, los animales presentaron los signos clínicos característicos de la enfermedad y donde se logró alcanzar el período de incubación y el curso de la enfermedad, los cerdos inoculados antes de morir, desarrollaron una respuesta inmunitaria en contra del agente infeccioso.

Se pudo establecer la dosis infectante con el virus de campo VC-89-126 que permitió desarrollar una respuesta adecuada de anticuerpos aún cuando la cepa está clasificada como de alta virulencia.

Una vez obtenidos los sueros con anticuerpos contra el virus de la FPC se evaluó el reconocimiento de las proteínas del virus de campo y del vacunal, mediante la técnica de inmunotransferencia.

Se logró determinar el patrón electroforético de las cepa vacunal PAV-250 y de la de campo VC-89-126, y se encontraron diferencias en las proteínas entre ambas "cepas".

La respuesta serológica solo se pudo establecer con la cepa de campo VC-89126, ya que en las pruebas de inmunotransferencia no se obtuvo respuesta contra las proteínas de la cepa vacunal PAV-250. La respuesta de anticuerpos contra las proteínas del virus de campo fue inicialmente contra las proteínas de alto peso molecular y posteriormente contra las de bajo peso molecular.

## 1.0 Generalidades.

La Fiebre Porcina Clásica (FPC) fue reportada inicialmente en 1833 en Ohio y se especuló que en ese tiempo que la FPC era una nueva enfermedad de los cerdos. La naturaleza viral de la FPC fue propuesta a principios de siglo cuando Schweinitz y Dorset reportaron la transmisión de la FPC usando los fluidos corporales de cerdos que se habían hecho pasar a través de "filtros finos de porcelana". Los hospederos naturales del virus de la FPC (VFPC) son los suinos. La Diarrea Viral Bovina (BVD) y la Enfermedad de la Frontera de los Borregos (BD) fueron descritas en los años 1940s y 1950s, respectivamente. Sin embargo, no es hasta 1960 que los virólogos informaron que los agentes causales de las tres enfermedades están relacionados antigenicamente. Darbyshire descubre una reacción serológica cruzada entre VFPC y el virus de la Diarrea Viral Bovina (BVDV). Posteriormente, basándose en su morfología y la polaridad de su genoma, estos virus fueron clasificados dentro del género *Pestivirus* en la familia *Togaviridae*. Recientemente los resultados concernientes a la organización y expresión de sus genomas permitieron su reclasificación de estos virus como un género de la familia *Flaviviridae*. El nombre del género es derivado de la FPC. Otros idiomas refieren a la FPC como *pestis suum* (Latín), *Swinpest* (Suizo), *Schweinepest* (Alemán). Todos los pestivirus tienen un impacto económico negativo y significativo para las industrias agropecuarias a nivel mundial.

La Fiebre Porcina Clásica (FPC), es una enfermedad infecciosa producida por un virus altamente transmisible y de rápida diseminación, se transmite principalmente a través de secreciones y excreciones nasales, lagrimales, orina, heces y mecánicamente, así como por moscas, pájaros, utensilios, desperdicios de alimento y comida; en México ha estado presente por alrededor de 100 años (6).

Su presencia, ha provocado importantes pérdidas a la porcicultura nacional además del impacto negativo en la exportación de animales en pie, carne y subproductos derivados de esta importante especie pecuaria.

### **1.1 La Fiebre Porcina Clásica (Cólera Porcino) historia y distribución mundial**

La Fiebre Porcina Clásica se originó en los Estados Unidos (1810-1833) en Tennessee y Ohio. En Europa apareció en Francia e Inglaterra (1822-1962); en Sudamérica (1899) y en Sudáfrica (1900)

Durante ese tiempo los países de Europa comenzaron a tomar medidas de control, aún desconociendo el agente etiológico y la epidemiología. Como fue el caso del Reino Unido que prohibió la importación de cerdos vivos del continente Europeo desde 1882. Conforme se fue conociendo la naturaleza de la FPC, las medidas simples restrictivas consistieron en prohibir la importación de animales en pie y sus derivados, como sucedió en Dinamarca (1933), Irlanda (1958), Reino Unido (1966), Hungría (1972) y Estados Unidos (1976).

### **1.2. LA FPC EN MEXICO.**

La Fiebre Porcina Clásica (FPC) fue introducida al país en el año de 1877 a través de la importación de pie de cría procedente de los Estados Unidos de Norteamérica. (4).

En México como en otros países se prefirió proteger la población de cerdos vacunando contra la FPC (6).

A partir de 1973, se establece en México un programa formal para el control y erradicación de esta enfermedad en la región Noroeste, pretendiendo abarcar los Estados de Baja California, Baja California Sur y Sonora. Las estrategias y conceptos de este plan, así como el conocimiento e información de la importancia de la FPC, propiciaron el inicio del Programa de Erradicación en el Norte del

Estado de Sonora, así como un programa intensivo de control en el Sur del Estado en 1978 (6).

Esta situación, junto con la amenaza que representó para México la presencia de la Peste Porcina Africana en varios países del Caribe (Haití, República Dominicana y Cuba) y en Sudamérica (Brasil), motivó la necesidad de implementar con carácter obligatorio y permanente la Campaña Nacional Contra la Fiebre Porcina Clásica, la cual oficialmente quedó establecida el 25 de marzo de 1980.

El 29 de octubre de 1996 se publica en el Diario Oficial de la Federación la Norma Oficial Mexicana NOM-037-ZOO-196, en la cual se establecen los requisitos que debe cumplir la Campaña Nacional Contra la Fiebre Porcina Clásica y se mencionan principalmente las tres fases que comprende dicha campaña y las cuales se describen a continuación.

Fase de Control.- Para que un Estado o zona sea considerada en la Fase de Control, debe cumplir con los siguientes requisitos:

- Vacunación intensiva en zonas de alto riesgo y de elevada población porcina.
- Control de la movilización de cerdos, sus productos y subproductos.
- Contar con un sistema eficaz de vigilancia epizootológica, notificación de focos de la FPC.
- Se prohíbe el uso de escamocha para la alimentación de cerdos, sin que sea previamente sometida a cocción por 30 minutos a 100 °C.
- En esta fase la Dirección General de Salud Animal, con base en evidencias del comportamiento epizootológico de la FPC, a su juicio podrá aplicar un programa de monitoreo y centinelización.
- Contar con un censo de las Unidades de Producción Porcina.

Fase de Erradicación.- Para que un Estado o zona pueda avanzar de la Fase de Control a la Fase de Erradicación de la FPC debe haber cumplido con los puntos señalados en la fase de control, además de:

Suspensión de la comercialización y aplicación de vacunas contra la Fiebre Porcina Clásica

- Ausencia de focos o brotes de la FPC en los 12 últimos meses.
- Contar con los sistemas de vigilancia epizootiológica y el Dispositivo de Emergencia en Sanidad Animal.
- Reforzar el sistema de control cuarentenario a través de la implementación y operación de puntos de verificación en las principales vías de entrada al estado o región.
- Contar con un fondo de contingencia o esquema de aseguramiento para emergencias de casos de brotes de FPC, con la participación de los productores porcícolas y los gobiernos estatal y federal.
- Queda prohibido el uso de escamocha para la alimentación de cerdos.
- Realizar un programa de centinelización.
- Cuando una zona avance de Fase de Control a Fase de Erradicación de la FPC, después de haber transcurrido seis meses, se debe efectuar un muestreo representativo en cerdos de esa zona, el cual será planeado y ejecutado por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural en coordinación con los gobiernos estatales y con los productores.

Fase de Libre.- Para que un Estado, zona o región, en Fase de Erradicación ingrese a la Fase Libre, además de cumplir con las actividades descritas en las fases de control y erradicación:

- Debe haberse mantenido durante 12 meses en fase de erradicación y haber cumplido con la ausencia de focos o brotes de la enfermedad en los últimos 24 meses y efectuar los estudios epizootiológicos que determine la Dirección General de Salud Animal.

- Los Mecanismos de verificación que serán empleados en la Campaña Nacional Contra la FPC incluyen muestreos serológicos cada 6 ó 12 meses, los cuales serán programadas y ejecutadas por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural en coordinación con los gobiernos estatales y los productores.
- La declaración de una zona o Estado Libre se hará mediante acuerdo de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, que deberá publicarse en el Diario Oficial de la Federación.
- La presencia de un brote de la FPC en una Zona Libre, determinará la pérdida temporal del estatus de Zona Libre, la cual podrá ser recuperada cuando la dirección dictamine con bases en estudios epizootiológicos la ausencia del virus de la FPC.
- Queda prohibido el uso de escamocha para la alimentación de cerdos.

Los avances y la situación actual que guarda la campaña en cada Estado se resumen el Cuadro 1 y la Figura 1.

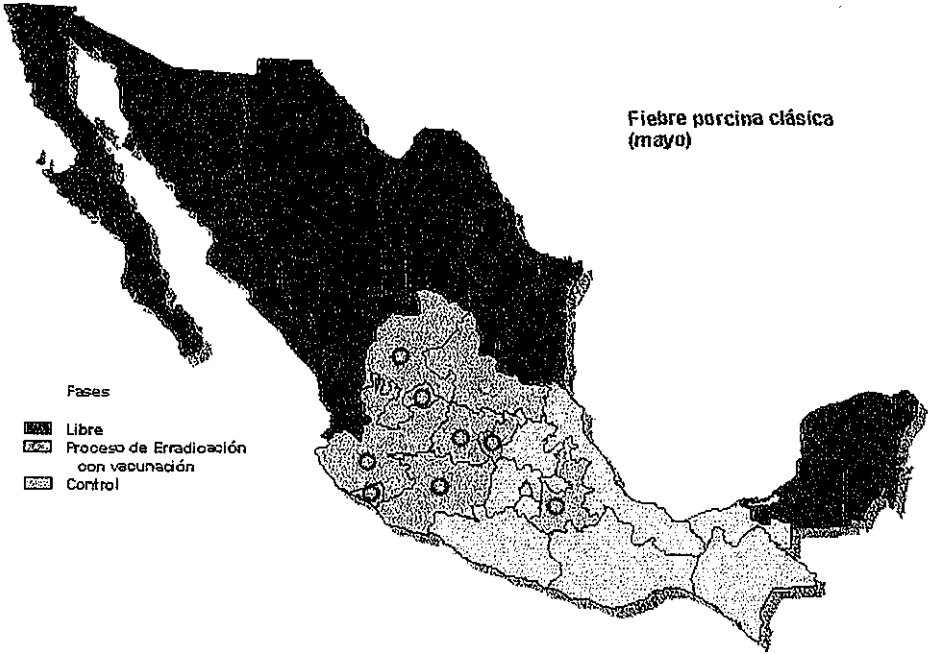
**CUADRO 1.- EN EL QUE SE MUESTRA LA SITUACIÓN ZOOSANITARIA DE LOS DIFERENTES ESTADOS DEL PAÍS HASTA EL 2 DE MAYO DEL 2000.**

ESTADO	SITUACION ZOOSANITARIA
Aguascalientes	Control (sin evidencia)
Baja California Norte	Libre (agosto 21, 1995)
Baja California Sur	Libre (agosto 21, 1995)
Campeche	Libre (mayo 13, 1999)
Coahuila	Control sin evidencias
Colima	Control sin evidencias
Chiapas	Control escasa prevalencia
Chihuahua	Libre (noviembre 23, 1995)
Región Lagunera	Control sin evidencias
Distrito Federal	Control
Durango	Control
Guerrero	Control sin evidencia
Hidalgo	Control
Jalisco	Control
México	Control
Michoacán	Control
Morelos	Control sin evidencias
Nayarit	Control sin evidencias
Nuevo León	Control
Oaxaca	Control sin evidencias
Puebla	Control
Querétaro	Control
Quintana Roo	Libre (Febrero 26, 1998)
San Luis Potosí	Control
Sinaloa	Libre (diciembre 17, 1999)
Sonora	Libre (junio 9, 1999)
Tabasco	Control sin evidencia
Tamaulipas	Control escasa prevalencia
Tlaxcala	Control sin evidencia
Veracruz	Control
Yucatán	Libre (julio 2, 1998)
Zacatecas	Control

Adaptado de <http://sagar.gob.mx/user/Conasag/situazoo.htm>.



**FIGURA 1.- SITUACIÓN ZOOSANITARIA DE LA CAMPAÑA CONTRA LA FIEBRE PORCINA CLÁSICA EN MÉXICO HASTA MAYO DEL 2000.**



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 1.3. Agente Etiológico

El agente etiológico pertenece a el orden Nidovirales, familia Flaviviridae, genero Pestivirus. El género de los pestivirus esta representado por el Virus de la Diarrea Viral Bovina 1 (BVDV), y que esta estrechamente relacionado con la enfermedad de la frontera o de Border, en borregos y la Fiebre Porcina Clásica en cerdos (106).

Los pestivirus son virus RNA, pequeños de 40-60 nm de diámetro de forma esferica. La envoltura presenta en su superficie proyecciones de 10 a 12 nm. La estructura y simetría del core no ha sido caracterizada. (106).

El ácido nucleico de los pestivirus se caracteriza por ser un RNA de cadena sencilla de una molécula simple de sentido positivo de aproximadamente 12.3 kb. Basado en datos indirectos, el extremo 5' probablemente no tiene protección y no hay presencia de poli A en el extremo 3'. El RNA geonómico contiene un solo marco de lectura abierto (ORF). La densidad boyante en sucrosa es de 1.10-1.15 g/cm<sup>3</sup> en sacarosa. El coeficiente de sedimentación S<sub>20w</sub> es de 140-150. La infectividad de los viriones es estable en un amplio rango de pH pero es inestable a temperaturas superiores de 40 °C. Los solventes y detergentes inactivan rápidamente a los virus. (106).

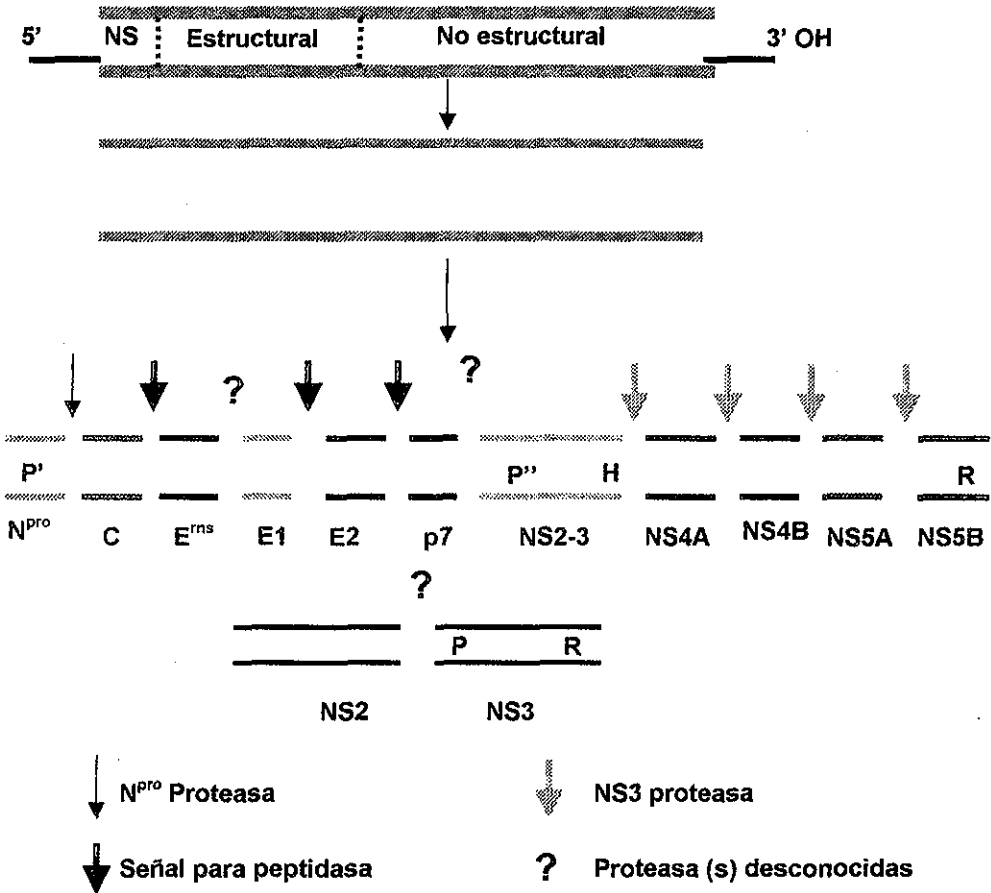
Los viriones están constituidos por cuatro proteínas estructurales: una proteína básica de nucleocápside y tres glicoproteinas de envoltura, E<sup>ms</sup>, E1, y E2. Las tres glicoproteinas existen como complejos unidas por puentes disulfuro: E<sup>ms</sup> homodímeros, E1-E2 heterodímeros, y E2 homodímeros. E<sup>ms</sup> posee una actividad de RNAsa intrínseca y es un producto único del gen de los *Pestivirus* que no se encuentra en otros miembros de la familia. Los pestivirus codifican para siete u ocho proteínas no estructurales (NS). N<sup>pro</sup> también una proteína única del género de los *Pestivirus*, es una proteinaza con actividad autocatalítica que se libera a si misma de la poliproteína naciente. La proteína no estructural p7 se presume que

tiene un papel en la maduración del virus. NS2-3 es una proteína multifuncional. El extremo amino terminal 40% (NS2) es hidrofóbico y contiene una región de dedos de zinc lo que sugiere su papel en la unión del RNA o en la replicación. El extremo carboxi terminal 60% (NS3) actúa como una serina proteínasa que está involucrada con el procesamiento de la poliproteína y también como una RNA helicasa/NTPasa involucrada en la replicación del RNA. La NS2-3 se ha encontrado en los virus no citopatógenicos de VBD. En los virus citopatógenicos y en los aislados de virus de fiebre porcina clásica (CSFV) pueden ser producidas al mismo tiempo a la NS2-3. La proteína NS4A actúa como un cofactor para la actividad de proteínasa de la NS3. El papel de la proteína NS4B es desconocido. La proteína NS5A es la única proteína de los pestivirus que está fosforilada y presumiblemente juega un papel en la replicación del RNA. La proteína NS5B tiene una actividad de RNA polimerasa dependiente de RNA (106).

El RNA genómico consta de una cadena sencilla larga ORF que codifica una poliproteína de aproximadamente 4000 aminoácidos que es precedida de un 5'-NCR de aproximadamente 360-385 nts y seguida por una 3'-NCR de aproximadamente 230 nts. El orden en el gen es 5'-N<sup>pro</sup>-C-E<sup>ns</sup>-E1-E2-p7-NS2-3(NS2-NS3)-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-3' (Fig 2).

La replicación de los pestivirus inicia por endocitosis mediada por receptores que involucra una o más moléculas de la superficie celular y las glicoproteínas virales E<sup>ns</sup> y E2. Después de la endocitosis y el desnudamiento, el RNA genómico sirve como un RNA mensajero, no hay moléculas subgenómicas de RNA mensajero. La traslación inicial ocurre por un mecanismo de internación que involucra un sitio de entrada intra ribosomal (IRES) dentro del extremo 5'-NCR del RNA. El procesamiento de la poliproteína ocurre co y postraslacionalmente por proteinasas tanto virales como del hospedero. La proteína no estructural N<sup>pro</sup>, la primera proteína del ORF, se une autoproteolíticamente a sí misma a la poliproteína nascente por unión al sitio N<sup>pro</sup>/C (106).

Figura 2.- Organización del genoma de los Pestivirus (no a escala) y el procesamiento de la poliproteína. El RNA, generalmente tiene un tamaño de aproximadamente 12.3 kb dependiendo del virus. La región 5' no codificante (NCR) es de aproximadamente 372-385 nts, el ORF de aproximadamente 11.7 kb y la 3' NCR es de 188-241nts. P', P'', H y r indican la localización de la N<sup>pro</sup>proteinasas, la NS3 proteinasas, la NS3 RNA helicazay la NS5B RNA polimeraza dependiente de RNA respectivamente.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

La unión naciente que produce las proteínas estructurales C, E<sup>ns</sup>, E1 y E2 probablemente están mediadas por señal de peptidasa(s) celulares. La traslocación de la glicoproteína a el retículo endoplásmico probablemente ocurre por una secuencia señal interna, talvez entre la proteína C. El corte entre las proteínas E2 y p7 no es completo, dando lugar a las dos formas intracelulares de E2 con diferentes terminaciones en el extremo C. dependiendo del virus, la proteína NS2-3 se mantiene intacta (virus no citopáticos) o puede ser también encontrada con productos terminales en N y C como NS2 y NS3 (virus citopáticos). El mecanismo por el cual se genera NS3 involucra eventos de RNA recombinacional. El virus citopático de BVD tiene inserción de genes, deleciones, duplicaciones o rearrreglos que de alguna manera permiten la producción de NS3. La actividad de serina proteinasa de la NS3 (y esta de la proteína NS2-3 en los virus no citopáticos) es la responsable del procesamiento temprano de la poliproteína. La proteína NS4A facilita la unión de la proteína NS3 a los sitios 4B/5A y 5A/5B (106).

La replicación del RNA sucede en asociación con membranas intracitoplásmicas, presumiblemente en un complejo de replicación compuesto por RNA viral y proteínas virales no estructurales. Formas replicativas del RNA de los pestivirus han sido detectadas. La proporción de RNA con sentido positivo a negativo en las células des pues de 12 horas postinfección es de aproximadamente 10. la síntesis de RNA es resistente a la actinomicina D. La maduración del virus esta poco entendida. Sin embargo, no se han detectado proteínas virales en la superficie celular, lo que sugiere que la maduración del virus es en vesículas intracelulares y la liberación es por exocitosis. Cantidades considerables de virus se mantienen en asociación con la célula. La síntesis de proteínas y de RNA de la célula huésped continua durante toda la infección (106).

Los pestivirus están relacionados antigenicamente y reacciones cruzadas en epitopes están presentes en todos los pestivirus. Determinantes antigenicos separados han sido identificados mediante el empleo de anticuerpos

monoclonales (Mabs). Marcadas variaciones antigenicas han sido detectadas entre los virus de BVD aislados. La porción N-terminal de la proteína E2 contiene una región hipervariable. Los patrones de reconocimiento de los Mabs son generalmente consistentes con los virus con los que están relacionados (106).

Los animales infectados montan una fuerte respuesta de anticuerpos hacia dos glicoproteínas estructurales ( $E^{ms}$ , E2) y a la proteína NS3, mientras que la respuesta de anticuerpos contra todos los polipéptidos codificadas por el virus es pobre o no existe. Los anticuerpos contra  $E^{ms}$  y E2 son capaces de inducir protección independientemente. Los anticuerpos monoclonales que reaccionan con estas proteínas pueden neutralizar la infectividad del virus mientras que los anticuerpos contra la proteína NS3 no son capaces de neutralizar la infectividad viral (106).

#### **1.4. Propiedades virales.**

El VFPC es resistente a tratamientos físicos y químicos, es parcialmente dependiente del estado físico del material que contiene el virus. Por ejemplo el VFPC en fluidos de cultivos celulares es inactivado en 10 min. a 60 °C, mientras que la infectividad no es destruida, en la sangre desfibrinada, a una temperatura de 68 °C por 30 min. El VFPC es estable dentro de un amplio rango de pH, pero entre el pH 4 y el cercano a 10, su infectividad se ve debilitada. El VFPC se inactiva rápidamente con solventes como el cloroformo y el éter, porque el virión contiene lípidos en su envoltura. El virus puede permanecer infeccioso por meses, en cerdos y subproductos de cerdos, siendo este un factor epizootiológico importante. El virus es inactivado por el hidróxido de sodio al 1%, el cual es considerado como un buen desinfectante para las superficies contaminadas por el VFPC (44,88).

Los cultivos celulares de riñón de cerdo son frecuentemente utilizados para el aislamiento y amplificación del VFPC. El virus generalmente no causa efecto

citopático y se replica únicamente en el citoplasma de la célula. El antígeno viral puede ser detectado a partir de las 4 hrs después del período de incubación, mediante la técnica de los anticuerpos fluorescentes; a las 5 hrs del periodo de incubación la primera progenie empieza a liberarse. Bajo condiciones simples de ciclo de recuperación, hay una parte exponencial incrementada en el título viral a las 15 hrs del período de incubación, después la producción de virus continua por algunos días alcanzando algunos picos entre  $10^7$  y  $10^8$  UFP. En cultivos celulares los virus se distribuyen por la vía del medio, también mediante los puentes citoplasmáticos intercelulares y de célula madre a célula hija durante la mitosis. Se ha establecido que los cultivos celulares infectados con el VFPC, persisten infectados. Los estudios de microscopía electrónica sugieren que los virus maduros están sobre la membrana intracitoplasmática. Estas evidencias son apoyadas por la inhabilidad para detectar antígenos de VFPC sobre la superficie de las células infectadas (1,56,95).

Pirtie y Mengeling han encontrado variaciones antigénicas entre las "cepas" de VFPC; encontraron que 2 "cepas" de VFPC fueron neutralizadas en alto grado por su antisuero homólogo así como por un antisuero heterólogo. Corthier y cols. encontraron evidencia de subgrupos serológicos, en base a diferentes grados de neutralización de varios antisueros contra el virus de BVD. El estudio reveló que existe un grupo de "cepas" virulentas y de "cepas" atenuadas, mientras que en otro grupo se incluyen "cepa" moderadamente virulentas y de baja virulencia. Kamijyo y cols. también distinguieron 2 subgrupos antigénicos y un grupo de virus aparentemente más virulento (18,40,61)

El virus de la FPC está estrechamente relacionado antigénicamente con el virus de BVD. Estos dos virus dan reacciones cruzadas en las pruebas de inmunodifusión y de inmunofluorescencia, y algunas "cepas" también con el Ensayo de Neutralización. La inmunización de cerdos con DVB puede conferir

protección contra el desafío con una "cepa" virulenta del VFPC. Ocasionalmente los dos pestivirus, los cuales son difíciles de identificar y diferenciar uno de otro (VFPC y DVB), pueden ser aislados de cerdos en el campo (95).

Existen "cepas" de campo del VFPC, que muestran en un amplio rango de patogenicidad, desde muy virulentas hasta casi avirulentas. Las "cepas" de alta virulencia producen la enfermedad aguda con 100% de mortalidad. Las "cepas" de moderada virulencia generalmente conducen a las presentaciones subagudas o crónicas y los cerdos subsecuentemente mueren o se recuperan. Los cerdos infectados posnatalmente con "cepas" de baja virulencia, usualmente presentan una enfermedad muy ligera, o sin signos y desarrollan inmunidad. Las "cepas" de FPC pueden generar anormalidades fetales; aunque existen "cepas" artificialmente atenuadas, usadas como vacunas, las cuales son avirulentas aún para los fetos. (95).

Los factores del hospedador parecen influenciar en el resultado de las infecciones con "cepas" del VFPC. Ha sido informado que la virulencia del VFPC puede ser una propiedad inestable; como ejemplo, las "cepas" del VFPC parecen incrementar en virulencia mediante pasajes a través de los cerdos (28).

### **1.5. Epizootiología, transmisión.**

Experimentalmente, el VFPC ha sido transmitido por diferentes vías: oral, nasal, conjuntival, aerogéna, genital y por vías parenterales. Las vías oral y nasal son probablemente las más comunes en el campo. Los cerdos que han sido infectados con el virus VFPC pueden diseminar el virus desde el periodo de incubación, antes que los signos de la enfermedad se muestran. Durante la enfermedad es excretado en: saliva, fluidos nasales y lagrimales, orina y heces. Los cerdos, que sobreviven a una infección aguda o subaguda, desarrollan anticuerpos y no diseminan el virus por largo tiempo. Por otro lado los cerdos



infectados por una "cepa" de virulencia moderada pueden sufrir una infección crónica y excretar el virus continua o intermitentemente hasta morir. El VFPC puede cruzar la barrera placentaria y las cerdas preñadas que han sobrevivido a una infección, pueden después abortar o producir lechones momificados, nacidos muertos o débiles, con ascitis, edema, tremor y malformaciones. Por otro lado la infección postnatal con "cepas" de baja virulencia, se caracterizan por períodos cortos de excreción y multiplicación viral seguida de una respuesta inmunitaria. Como una consecuencia, las "cepas" virulentas del virus del FPC, usualmente se distribuyen más rápidamente en la piara, e inducen una más alta morbilidad y mortalidad que las "cepas" de baja virulencia. Los cerdos infectados crónicamente distribuyen el virus continua o intermitentemente, hasta morir. La forma más insidiosa es la infección congénita causada por "cepas" de baja virulencia; las cuales pueden diseminar el virus de la FPC continuamente por meses, sin mostrar los signos de la enfermedad o desarrollar una respuesta inmunitaria. Las infecciones crónicas y persistentes constituyen el mejor mecanismo de perpetuación del virus en epizootias causadas por "cepas" de baja virulencia (17, 26,34,50,65,96,104).

No todas las "cepas" vírales se diseminan de igual forma. Mientras los cerdos infectados con el VFPC diseminan el virus en altas cantidades durante el período completo de la enfermedad, la infección posnatal con "cepas" de baja virulencia se caracteriza por períodos cortos de multiplicación viral y excreción, seguidos por una respuesta de anticuepos. Como una consecuencia, generalmente del VFPC de alta patogenicidad se distribuirán rápidamente en una piara infectada e inducirán una más alta morbilidad y mortalidad, que las "cepas" de baja virulencia (61).

La distribución del virus puede ocurrir por varios principios. Movilización de cerdos, que estén incubando la enfermedad o cirzando una infección persistente, lo cuál es la causa más común de un brote. La infección usualmente se origina en las granjas que tienen cerdos en crecimiento, pero puede ser también debida a

contactos con excreciones vírales de los cerdos o tráfico de cerdos contaminados, o en un medio ambiente contaminado durante el transporte. Movimiento de "cerdas portadoras" cargadas puede causar una infección (61).

El VFPC puede sobrevivir en el cerdo o en sus subproductos. La sobrevivencia puede ser prolongada por meses y aún por años, cuando la carne es almacenada, congelada o refrigerada (61).

Los cerdos susceptibles pueden contraer la enfermedad, al ingerir desechos de la cocina o comida (escamochas) cuando no han sido tratados adecuadamente antes con calor. En esta forma el virus puede ser transmitido a través de distancias y causar brotes en áreas libres (61).

La transmisión mecánica por el hombre es de gran importancia, significativa en áreas con una densa población de cerdos. Granjeros, castradores y veterinarios pueden transmitir el virus al utilizar ropa, botas, instrumental y medicamentos contaminados, especialmente los de uso parenteral (61).

El VFPC puede ser transmitido mecánicamente por el artrópodo hematófago que comúnmente esta presente en las granjas, como el piojo (*Haematopinus suis*) y varias especies, de moscas, (*Stomoxys tábanos* y *Aedes*). La replicación de VFPC dentro de los artrópodos nunca ha sido demostrada. La diseminación del virus de las pias infectadas a las susceptibles está limitada por la distancia; hay más diseminación mientras se encuentren en más estrecha proximidad, junto con una alta densidad de vectores (61).

La transmisión del VFPC a través del aire exhalado, en época de lluvia, es cuestionable que juegue un papel importante en la epizootiología. El papel de transmisores que juegan los perros, gatos, roedores y pájaros también es cuestionable (75,76).

Infecciones aerogénicas, pueden ocurrir a través de las puertas, jugando un papel importante en la distribución del virus patógeno de granja a granja. El VFPC puede circular en cerdos silvestres, y esto, en algunos países puede ser un peligro para el cerdo doméstico (26).

### 1.5.1 Transmisión natural

En condiciones de campo la principal forma de transmisión es por contacto directo, entre cerdos infectados y los susceptibles, con excreciones y secreciones de los animales enfermos. Esto ocurre al introducir en la granja cerdos enfermos o portadores y al transportar animales susceptibles en vehículos contaminados (10).

### 1.5.2 Cerdas portadoras del virus

Cuando las cerdas preñadas son expuestas a las "cepas" de baja o de moderada virulencia, las infecciones iniciales no son frecuentemente notificadas, pero el virus puede ser transmitido a los fetos "*in útero*". Dependiendo de la virulencia de la "cepa" viral infectante y del estado de gestación, las cerdas pueden tener abortos o fetos momificados, o nacidos muertos, o cerdos nacidos débiles.(100).

La transmisión congénita se presenta cuando las cerdas gestantes son expuestas a "cepas" de VFPC de baja virulencia y hay transmisión del virus a los fetos. Weenvoort y cols. (1986) investigando úteros grávidos de marranas de piaras infectadas, encontraron que el llamado "síndrome de la marrana portadora", puede ocurrir hasta en un 43% de las marranas preñadas de una piara. La persistencia del virus de FPC en los fetos y placentas puede diseminar grandes cantidades del virus a la piara. La transmisión da como resultado fetos momificados, mortinatos, malformaciones, animales prematuros y lechones débiles con temores; estos últimos pueden ser reservorios y diseminar grandes cantidades de virus durante 4 a 6 meses, sin estar mostrando signos de la enfermedad o desarrollo de respuesta inmunitaria (100).

### **1.5.3 Movilización de animales.**

La diseminación del virus de una pira infectada a una susceptible puede efectuarse por varios caminos. El movimiento de cerdos que estén incubando la enfermedad o con infecciones persistentes, es el modo más común. La infección se origina directamente de las granjas infectadas; el contacto estrecho de los cerdos susceptibles con los cerdos que excretan el virus, durante el mercadeo o durante el transporte, puede ocasionar una considerable diseminación viral. Algunas veces cuando se les ponen a los animales inyecciones de sedantes, contribuyen a una mayor diseminación del virus ya que por medio de las agujas el virus puede ser transmitido de un animal a otro. La movilización de cerdas gestantes "portadoras" introducirá la infección en las piras receptoras (61),

### **1.5.4 Papel del cerdo y sus subproductos.**

El VFPC es resistente cuando está en un medio ambiente rico en proteínas y puede sobrevivir en cerdos y sus productos a pesar de su procesamiento. La supervivencia del virus puede ser prolongada, por meses y hasta por años, cuando la carne es almacenada en refrigeración y congelación, respectivamente. En estas condiciones el virus puede ser transportado a través de grandes distancias y ser introducido a países y áreas libres de esta enfermedad. Los cerdos susceptibles pueden contraer la enfermedad cuando la granja está contaminada o por ingerir desechos de alimentos contaminados (28). La basura de restaurantes y escamochas mal cocidas, puede generar que el virus permanezca viable por un tiempo en ellas (83).

### **1.5.5 Transmisión mecánica por el hombre.**

La transmisión mecánica del VFPC por el hombre, es muy significativa en áreas con alta densidad de cerdos y de pjaras. Los granjeros, los castradores, inseminadores, vacunadores y veterinarios pueden transmitir el virus al utilizar instrumentos contaminados, por ejemplo al aplicar los medicamentos, etc. Es común encontrar que los porcicultores no hacen el cambio de agujas, individualmente ya que se utiliza la misma para varios animales; de modo que esto constituye un enorme riesgo en el caso de utilizar la aguja primero en animales virémicos y después en animales susceptibles.

### **1.5.6 Transmisión por vectores (artrópodos).**

Aunque de menor importancia, la transmisión por artrópodos hematófagos puede contribuir dentro de ciertas circunstancias a la transmisión de la FPC. Dorset y cols., en 1991, describieron la transmisión de la FPC por moscas (*Musca domestica*) y por moscas de establos (*Stomoxys calcitrans*). El VFPC fue transmitido por la inoculación de una suspensión homogeneizada de moscas domésticas y por las picaduras de moscas de establo. Miller y cols., en 1974, aislaron el VFPC de moscas domésticas y de moscas de establo (24,57).

## **1.6. Patogenia y manifestaciones clínicas**

En condiciones naturales la entrada del VFPC es por las vías oral y nasal. Ocasionalmente el virus penetra por la mucosa de la conjuntiva, genital, o por raspaduras en la piel. El virus infecta y se replica inicialmente en las células epiteliales de las criptas de las tonsilas y se difunde posteriormente a los tejidos linfoides, multiplicándose en las células del tejido endotelial. A partir de las tonsilas, el VFPC es transferido, vía vasos linfáticos, a los ganglios linfáticos: el

virus se replica y pasa a sangre periférica, de ahí al bazo y a los ganglios viscerales llegando al intestino delgado. Como resultado de la diseminación en tejidos linfoides y en el aparato circulatorio, el nivel de viremia es alto; el virus causa ocasionando leucopenia y trombocitopenia, manifestándose una inmunosupresión, lo que hace al animal más susceptible a infecciones secundarias. El virus no invade los órganos parenquimatosos, sino hasta después de la fase de viremia; a las 48 horas postinfección llega a la médula ósea, timo, bazo, hígado y ganglios linfáticos. La causa principal de la muerte no se conoce; se considera que el animal muere al ocurrir una trombocitopenia marcada, liberación masiva de sustancias vasoactivas y el consecuente choque hipotensivo agudo (61).

En infecciones intrauterinas las "cepas" de baja virulencia de VFPC atraviesan la placenta llegando a los fetos, los cuales después de la mitad de la gestación, desarrollan anticuerpos específicos que no son maternos; generalmente el daño fetal es alto. Cuando los fetos son infectados en el primer tercio de la gestación, los animales que llegan a nacer pueden presentar un estado de tolerancia inmunológica; en el cual el virus es capaz de multiplicarse por periodos largos sin que se desarrollen anticuerpos, ni ocurra una respuesta inmunitaria protectora, de esta manera se convierten en portadores sanos. Estos lechones tienen toda la vida niveles altos de viremia, la cual puede ser transitoria después de la ingestión de anticuerpos calostrales (61).

### **1.6.1 Infección aguda.**

En la FPC la distribución del virus a través del hospedador se caracteriza por una fase linfática, una virémica y una fase visceral.

Las tonsilas son los órganos blanco primario para la multiplicación viral. Después de iniciada la replicación, el virus es transferido, por la vía de los vasos linfáticos a los nódulos linfáticos, drenando la región tonsilar. Los virus entonces alcanzan

los capilares de sangre eferente, dando un importante incremento en la viremia inicial y el virus es atrapado en el bazo (66).

Los órganos blancos secundarios son los tejidos que producen grandes cantidades de virus, resultando altos títulos de infectividad en la sangre periférica. Subsecuentemente el VFPC se replica en otros tejidos del sistema inmunitaria, como son nódulos linfáticos viscerales y en las estructuras linfoides del tracto digestivo y de la médula ósea. Esto sucede presumiblemente después de la fase virémica, que es cuando los virus invaden los órganos parenquimatosos. Generalmente, los títulos del VFPC en el tejido linfoide son más altos que en los órganos parenquimatosos (66).

El VFPC tiene predilección por las células reticulares, endoteliales y epiteliales. Los virus inicialmente infectan las células epiteliales de las criptas tonsilares y después se distribuyen dentro del tejido linforeticular. Después de una fase de replicación, la cuál ocurre particularmente en los nódulos linfáticos, la infección de las células endoteliales es presumiblemente mediada por células del sistema del retículoendotelial. El tiempo en el cuál se distribuye el virus depende principalmente de la virulencia del virus. Las "cepas" de alta virulencia pueden ser detectadas en la mayoría de los órganos a los 5-6 días de la infección o primoinfección (66).

La FPC aguda desarrolla severa trombocitopenia y desórdenes de la síntesis del fibrinógeno. Estos desórdenes en conjunción con la degeneración de las células endoteliales, causan petequias, equimosis, estrías y múltiples hemorragias en los estados terminales de la FPC. La mortalidad en las infecciones agudas alcanza hasta el 100%. El mecanismo responsable de la muerte no es bien conocido, pero los severos desórdenes de circulación parecen ser un factor determinante (32).

Al tercer día de la enfermedad la temperatura es de 40 °C, luego sube a 41 ó 42 y después la temperatura llega a ser subnormal y durante estos períodos hay *inactividad del animal y se presenta anorexia. Hay leucopenia, las cuentas*

normales varían de 10 a 40,000 glóbulos blancos por  $\text{mm}^3$  (con un promedio de 21,000), pero en la FPC bajan hasta llegar a los 9,000 o incluso a 3,000 (entre el 4o y 7o días). Hay que tomar en cuenta que los cerdos sanos menores de 5 semanas, normalmente tienen una cuenta leucocitaria baja (10).

Al principio de la enfermedad hay baja de glóbulos blancos. Pero pocos días después, cuando al animal le bajan sus defensas y tiene muchas hemorragias internas habrá invasión de bacterias al interior del organismo. Por lo que el número de leucocitos aumenta. También puede haber trombocitopenia; inicialmente baja el número de leucocitos al mismo tiempo baja la cantidad de plaquetas y después éstas empiezan a aumentar. Este es otro dato con el que se puede llegar al diagnóstico, sobre todo en aquellos lugares en donde no hay cerca un laboratorio que pueda trabajar con inmunofluorescencia. El número normal de trombocitos varía de 200,000 a 500,000/ $\text{mm}^3$  y en la FPC baja de 50,000 hasta 20,000, es decir, al 10 %. (10).

Hay conjuntivitis, descarga nasal, disnea, constipación en algunos y diarrea en otros, vómito (sobre todo en la primera fase de la enfermedad); el amontonamiento es una observación que los clínicos toman mucho en cuenta sobre todo para diferenciar con erisipela, ya que en erisipela no hay amontonamiento. Varios días después de que sube la temperatura a 40 ó 41 °C, habrá hipotermia (cuando ya el animal está muy mal) y la temperatura le baja a 37 ó 38 °C. Hay incoordinación del tren posterior, los animales caminan ladeados y arrastran los patas; hay hiperemia en la piel, que después estará congestionada y finalmente cianótica. Estos grados dependen del avance de la enfermedad; después los animales ya no se pueden levantar y al final pueden mostrar convulsiones (movimientos de natación). Puede haber también diarrea acompañada de melena. Los casos crónicos pueden presentar áreas de decoloración en la piel de las orejas, alopecia y retraso de crecimiento (10).

Se han observado clínicamente casos atípicos de FPC producidos por "cepas" de campo, de baja virulencia o de origen vacunal, tratándose de vacunas poco



atenuadas. que pueden ocasionar la presentación del temblor congénito (o mioclonia congénita), al nacimiento de los lechones o pocas horas después, con temblores de la cabeza, cuello, lomo y miembros posteriores, debilidad, pocos deseos de mamar y pérdida del equilibrio. Cuando este problema se asocia a la utilización de vacunas de virus vivo modificado, aplicadas a los 20-97 días de gestación habrá ascitis y deformidades (10).

Los recién nacidos procedentes de madres no vacunadas pueden morir de FPC aguda sin que se presenten signos en las cerdas. Esto se ha visto a consecuencia de la infección por "cepas" de campo de baja virulencia, que no enferman a las madres, pero sí a los lechones procedentes de hembras no vacunadas. Los cerdos susceptibles también pueden enfermar al ponerlos en contacto con cerdos sanos previamente inmunizados con vacunas de virus vivo poco modificado. En los casos sobreagudos generalmente no se observan lesiones; en los casos agudos y subagudos habrá lesiones de tipo septicémico, por lo que hay que hacer el diagnóstico diferencial con cualquier enfermedad septicémica, como la erisipela, pasteurelisis y sobre todo salmonelosis septicémica. En los casos agudos y subagudos de FPC habrá petequias y hemorragias equimóticas en muchos órganos y tejidos, porque hay circulación sanguínea lenta y porque hay degeneración hidrópica de las células endoteliales (que recubren la cara interna de los vasos sanguíneos), lo que ocasiona rupturas de los vasos y extravasación, lo que da lugar a que se formen las equimosis y los infartos (10).

Se presentan hemorragias en los riñones, ganglios y en las serosas y congestión en la piel (sobre todo en las regiones crurales internas y en la abdominal). En los ganglios linfáticos habrá edema, aumento de volumen, congestión, petequias y hemorragias. Las tonsilas presentan inflamación y después necrosis, ulceraciones y abscesos, causados por los infartos e invasiones bacterianas secundarias. Los pulmones muestra congestión, infarto, hemorragias,

bronconeumonía, pleuritis y atelectasia. El corazón presenta congestión del miocardio, infartos y a consecuencia de las infecciones secundarias, hidropericarditis y hemorragias. Al abrir las costillas longitudinalmente a la altura de la unión con el esternón, se observa que la línea blanca está calcificada. Esta lesión se presenta principalmente en los casos crónicos y es más notable entre la sexta y octava costilla aunque en todas las demás también se puede presentar. En el bazo hay infartos subcapsulares que son casi patognomónicos, se presentan principalmente en los bordes y a veces dentro del parénquima. Al vacunar a los cerdos con vacunas Lapinizadas (de bajo pasaje) muy poco atenuadas y sin combinarlas con suero hiperinmunitaria (o al aplicarlas con sueros inefectivos) se observa que el 20 % o el 40% de los animales mueren a causa del virus vacunal, y en el bazo se presentan pequeños infartos subcapsulares. En la vesícula biliar sólo en muy raras veces hay edema en la serosa (en el caso de la peste porcina africana, en la vesícula biliar muy frecuentemente hay edema muy marcado). La bilis está muy espesa, tiene un tinte hemorrágico y hemorragias en la mucosa. Hay infartos, hemorragias y necrosis en el pulmón, riñón e hígado, y raras veces en el prepucio y en la lengua. En el riñón se presentan petequias, equimosis y hemorragias subcapsulares, en el parénquima y en la pelvícula renal. Esta lesión no es patognomónica. Los animales que duran muchos días enfermos son los que presentan más claramente estas lesiones denominadas comúnmente como huevo de pipila. En los casos agudos se pueden observar 2 ó 3 petequias en cada riñón, en el área subcapsular, las cuales pueden ser difíciles de localizar. La vejiga urinaria puede estar vacía, mostrando áreas de congestión, hemorragias y petequias y con contenido sanguinolento y espeso; raras veces con coágulos (10).

El encéfalo es un órgano sumamente importante para el diagnóstico, en los casos sospechosos se recomienda colectarlo y remitir un hemisferio en formol (QP) al 10%, para hacer histopatología, y el otro hemisferio hay que enviarlo congelado

en hielo seco, o por lo menos refrigerado y en glicerina, para intentar aislar el virus a partir de él. El encéfalo va a presentar lesiones de encefalitis, mielitis, infiltración vascular y perivascular, inflamación endotelial e infiltración mononuclear, hemorragias microscópicas perivasculares y áreas de hialinización. En el corazón hay áreas de inflamación, disociación del sarcoplasma perinuclear y a veces hay cuerpos de inclusión intranucleares, según algunos autores; en los ganglios linfáticos estos cuerpos de inclusión aparecen entre el 6º y 12º días de la infección. En las áreas calcificadas de las epífisis de las costillas hay aumento del área de las células maduras cartilaginosas, entre la zona de multiplicación de células cartilaginosas y la zona ósea trabecular, esto es especialmente notorio en los casos crónicos. En las glándulas adrenales hay hipertrofia de la corteza, ampliación de la zona fasciculada y atrofia de las zonas restantes. Las lesiones del endotelio vascular son las más importantes, ya que el virus ataca a los endotelios vasculares, ó sean las envolturas internas de los vasos sanguíneos. Los capilares endoteliales presentan degeneración hidrópica, necrosis, hemorragias, marginación de leucocitos e infartos (10).

Los signos de la infección aguda aparecen después del período de incubación de 2 a 6 días. Los signos primarios son fiebre, pérdida del equilibrio, movimientos lentos, y un apetito reducido; estos se agravan en los días siguientes. Los picos de temperatura son cercanos a los 42 °C. A principios de la enfermedad los cerdos desarrollan principalmente conjuntivitis con una descarga ocular marcada. En algunos casos la descarga de moco nasal purulento es evidente. El estómago también puede estar vacío, porque el animal ha dejado de comer por varios días; hay congestión y hemorragias en la mucosa, sobre todo en el área fúndica. Sin embargo, en los cerdos es muy frecuente encontrar hemorragias en el estómago a consecuencia de otros padecimientos. En la primera parte del colon y en la válvula ileocecal, se presentan úlceras botonosas, las cuales, en la válvula ileocecal no están tan claras como en la primera parte del colon. El virus de la FPC predispone el desarrollo de enteritis necrótica generalizada, ocasionada por

infecciones bacterianas. Las úlceras están cubiertas de exudado fibrinoso. En el intestino grueso también puede haber úlceras botonosas y cuando están en la primera parte es casi patognomónico (10).

Los signos del tracto digestivo incluyen constipación, seguida por diarrea y a veces con recurrencia de constipación; algunos cerdos vomitan un fluido amarillento conteniendo bilis. Los cerdos afectados tiemblan y se apilan unos con otros. Ocasionalmente pueden presentarse convulsiones. Durante los estados terminales de la enfermedad, la mayoría de los cerdos tienen un mal estado de carnes, muestran paso titubeante, seguido posteriormente de parálisis posterior. Una decoloración y un color púrpura (cianosis) extendido a través del abdomen, morro y orejas, pueden también presentarse en los lados internos de las piernas. El grado de mortalidad en la FPC aguda es de 95 al 100%. Muchos cerdos mueren entre los 10-20 días del inicio de la infección. Dunne, en 1975, distinguió entre la FPC aguda de la subaguda. Algunos cerdos infectados desarrollan signos similares, pero menos severos de la enfermedad y después de un período prolongado de incubación, sucumben a los 30 días postinfección (10, 28).

### **1.6.2 Infección persistente**

El virus persiste por un largo período, algunas veces durante la vida entera del hospedador. Los casos en los cuales persiste son generalmente causadas por los virus de baja y moderada virulencia. Las formas diferentes de la FPC persistente pueden corresponder a la forma crónica.

En la Fiebre Porcina Clásica crónica, Mengeling y Parker distinguen 3 fases clínicas: La enfermedad aguda; el mejoramiento clínico y la exacerbación de la enfermedad aguda. La fase aguda es esencialmente la misma que en la FPC aguda, pero los virus pueden diseminarse más lentamente y las concentraciones en suero y órganos tiende a ser bajo. En el período secundario, el título del virus

en el suero es más bajo o ausente. El antígeno viral tiende a estar limitado a las células epiteliales de las tonsilas, ileum, glándulas salivales y riñón. La ausencia temporal del virus del suero es el resultado probable de la formación de anticuerpos específicos, y/o de un decremento en el número de células que están liberando virus (56).

La ocurrencia simultánea del virus y anticuerpos puede resultar en la deposición de los complejos antígeno - anticuerpos en el riñón, un proceso que eventualmente se convierte en la glomerulonefritis (20).

Durante la tercera fase el virus también se dispersa por todo el cuerpo. Esto puede ser promovido por el agotamiento inmunitaria que parece desarrollar los cerdos infectados crónicamente los cuales serán más susceptibles a las infecciones secundarias bacterianas (56).

El brote tardío de la FPC se caracteriza clínicamente por un período largo inicial de ausencia de signos clínicos. Estas infecciones usualmente siguen a la exposición al VFPC de virulencia reducida en el período fetal. Los cerdos mostrarán una viremia de vida larga, con altos títulos, los cuáles pueden ser temporalmente suprimido después de la ingestión de anticuerpos calostrales. El antígeno del VFPC es distribuido a través del tejido epitelial, linfoide y retículoendotelial. Los cerdos infectados persistentemente no producen anticuerpos neutralizantes contra el VFPC, este es el camino para contribuir a la persistencia viral. Los factores que provocan la aparición de signos clínicos después de un período largo de incubación son desconocidos. Cuando los cerdos sobreviven a un período largo de incubación mayor de 30 días, la infección puede ser meramente terminada. La persistencia de la FPC da lugar a varias formas clínicas de FPC. Los cerdos que resultan infectados en la fase inicial pueden desarrollar la FPC crónica, durante la cuál su apariencia general es rara, de cerdos saludables. Esta enfermedad llamada "brote tardío", los cerdos infectados permanecen aparentemente sanos por un período largo, después del

cuál desarrollan signos clínicos. El síndrome posterior es usualmente asociado con infecciones congénitas. Formas intermedias e inaparentes de FPC persistente pueden ocurrir (7,20,25,96).

La FPC crónica se caracteriza por ser una enfermedad con períodos intermitentes y prolongados, con anorexia, fiebre, diarrea y alopecia, seguida por dermatitis, como uno de los signos representativos. La FPC crónica puede ocasionar la presentación de cerdos rojojos, estos pueden tener cabeza grande y tronco pequeño (debido al severo retardo de crecimiento) y lesiones en la piel; estos rojojos frecuentemente se paran con la espalda arqueada y el tren posterior bajo el cuerpo (10).

Mengeling y Packer, 1969, dividieron la FPC crónica en tres fases. Una reacción aguda primaria, con anorexia, depresión y fiebre; un período de mejoramiento clínico general; recaída y muerte (54).

En el estado terminal, los cerdos pueden estar anoréxicos, deprimidos y febriles. Los cerdos con FPC crónica pueden sobrevivir por algunos meses, pero todos eventualmente mueren (54).

Los brotes tardíos se caracterizan por un período inicial, durante el cual los cerdos se infectan y virtualmente permanecen libres de la enfermedad (96).

Los signos comienzan a desarrollarse a los pocos meses después de la exposición y consisten en anorexia moderada y depresión, conjuntivitis, dermatitis y diarrea; con disturbios del equilibrio y locomotores, y después parálisis del tren posterior. La temperatura corporal puede ser normal o elevada, la leucopenia es un signo consistente de FPC persistente, pero durante la parte final de la enfermedad se puede desarrollar la leucocitosis (54).

Las "cepas" de FPC de reducida virulencia, frecuentemente conducen a una enfermedad moderada y después los cerdos se recuperan. Los signos clínicos son: pérdida de apetito, del equilibrio, diarrea, fiebre y son generalmente

acompañados de leucopenia. Frecuentemente ocurren infecciones subclínicas (54).

### **1.6.3 Infección Congénita**

Cuando una cerda preñada es susceptible al VFPC, los fetos se pueden infectar por la vía transplacentaria. El VFPC cruza la placenta, y puede subsecuentemente distribuirse de feto a feto. El antígeno del VFPC se encuentra distribuido a través del tejido fetal. El resultado de la infección fetal está determinada por el desarrollo (edad del feto) en el momento de la infección y por la virulencia del virus infectante. Las "cepas" de baja y mediana virulencia del VFPC están involucradas en las infecciones congénitas. Van Oirschot y cols. describen el hecho de que en la FPC aguda la sangre periférica y linfocitos del bazo no respondieron consistentemente a los mitógenos de las células T y B; mientras que los nódulos linfáticos tuvieron una alta capacidad de respuesta. Los cerdos infectados subclínicamente pierden su capacidad de responder a los mitógenos de sangre periférica, linfocitos del bazo y a las células B (93,94).

Los linfocitos de sangre periférica de los cerdos persistentemente infectados con FPC tiene un decremento ligero en su respuesta a los mitógenos (95).

Cuando un contacto primario con el VFPC no es seguido por una respuesta normal de anticuerpos, puede resultar un tipo de hiperreactividad caracterizada por un período corto de incubación y una enfermedad más severa que en los cerdos infectados primariamente. En contraste con el fenómeno de sensibilización se ha descrito un aumento de la resistencia a la virulencia del VFPC, ya que los cerdos infectados persistentemente con el VFPC de virulencia reducida, tienen una sobrevivencia prolongada ante inoculaciones con "cepas" virulentas de FPC, ambos fenómenos ocurren en el campo (95).

Los mecanismos exactos de la patogénesis de la FPC no han sido bien entendidos. Kom y Matthaeus opinan que la FPC es una enfermedad causada

por desordenes de un sistema enzimático, principalmente de la producción de la quimiotripsina (32,43).

Después de un período corto de infección por el VFPC, las secreciones oronasal y lacrimal contienen virus. La orina y las heces pueden contener virus cuando el riñón y el tracto digestivo están infectados. El VFPC es excretado en altos títulos en las secreciones oronasales, más que de orina y heces. Los virus también pueden diseminarse por la piel (95).

Una infección del VFPC congénita puede dar como resultado el aborto, momificación fetal, nacidos muertos, o nacimientos de lechones débiles y con temblor, muertes neonatales, nacidos aparentemente sanos con una infección persistente; y cerdos normales con anticuerpos contra el VFPC. Pueden presentarse malformaciones de los órganos viscerales y del sistema nervioso central de los fetos. Muchos cerdos infectados "*in útero*" y nacidos vivos, mueren en un período corto, después de nacer, las hemorragias de la piel son comunes en estos cerdos (95).

### **1.7. Diagnóstico de laboratorio.**

La variabilidad de los signos clínicos y las lesiones postmortem en los casos de FPC, raramente proveen una base para un diagnóstico inequívoco. Además la Peste Porcina Africana, Pasteurelisis, Erisipela y la Salmonelosis pueden ser confundidas con una infección aguda de FPC. Por estas razones, el diagnóstico tentativo de campo debe ser confirmado mediante pruebas específicas de laboratorio, para la detección del virus o de antígenos específicos.

Las pruebas de laboratorio más usadas son: la determinación de leucopenia y de trombocitopenia. La prueba de anticuerpos fluorescentes es probablemente la más valiosa, siempre y cuando se tome en cuenta la historia clínica, los signos y las lesiones del animal. La más utilizada es la prueba de fluorescencia directa haciendo cortes de tejidos congelados, principalmente se recomienda hacer



secciones de amígdalas, aunque también se pueden hacer cortes de los ganglios; lo ideal sería congelar de inmediato estas muestras y transportarlas en hielo seco o en nitrógeno líquido al laboratorio. Un caso positivo a fluorescencia debe ser claramente positivo. También se pueden tomar fragmentos de amígdala, bazo y ganglio, se prepara un macerado, se inoculan células PK15 y se tiñen con un conjugado a las 16, 24, ó más horas postinoculación, y se ve si son positivas, utilizando un microscopio de fluorescencia (10).

Si hay datos inexactos o incompletos en la historia clínica, está será poco valiosa. Contando con datos exactos sabremos si hay probabilidades de que se trate de FPC o de otra enfermedad. El diagnóstico de laboratorio sólo nos ayuda a corroborar los datos de la historia clínica. Una buena historia clínica explicará las irregularidades que se llegaran a observar en alguna prueba diagnóstica. Por ejemplo, si al hacer una prueba de laboratorio se obtiene un resultado positivo a la FPC por fluorescencia, para poder definir si esto se debe a un brote por virus patógeno, como primer paso, se deberá analizar la historia clínica. En los EUA se ha utilizando una prueba de suero neutralización basada en la inhibición de la fluorescencia. Esta prueba ha resultado muy útil en aquellas áreas o países, en donde ya no se vacuna contra la FPC, de modo que los animales positivos, corresponderán a aquellos previamente infectados con virus de campo (10).

### **1.7.1 Diagnóstico diferencial e integral.**

La FPC presenta diversas manifestaciones clínicas, originadas por el grado de virulencia de la "cepa" infectante, confundiendo con enfermedades de variada etiología. Para obtener un diagnóstico preciso es necesario considerar los siguientes aspectos, que nos ayudarán a controlar en forma eficaz e inmediata la enfermedad: 1.-Historia clínica; 2.-Signos clínicos y lesiones observadas en la necropsia; 3.- Programas de vacunación; 4.-Alimentación con desperdicios de restaurantes o restos de comida casera no cocinada; 5.-Introducción de cerdas o

de sementales; 6.-Granjas vecinas en las que se presentan la enfermedad; 7.- Visita de personas o vehículos ajenos a la granja; 8.-Uso de antibióticos sin éxito (64).

El diagnóstico diferencial de FPC debe realizarse en los síndromes siguientes: A) Síndrome clásico Septicémico/Entérico/Encefalítico; B) Síndrome Encefalítico en Adultos; C) Síndrome Mioclónico en Lechones; D) Síndrome Encefalítico en Recién Nacidos; E) Síndrome de Lechones Débiles al Nacimiento; F) Síndrome de Abortos; G) Síndrome de Fetos Momificados (64).

### **1.7.2 Demostración del virus o de los antígenos virales.**

La prueba de inmunodifusión doble en agar (AGDT), usando páncreas, hígado o nódulos linfoides mesentéricos fue ampliamente usada para la detección del antígeno en el principio de los años 60's. Pero la falta de sensibilidad y especificidad dejó mucho que desear, la AGDT fue remplazada en todos los laboratorios por la prueba de inmunofluorescencia directa (DIFT) realizado sobre secciones de tejidos congeladas de los cerdos enfermos o muertos. Las muestras para este diagnóstico incluyen, tonsilas, hígado, riñón y la parte distal del íleon, éstas preferiblemente deben ser refrigeradas en el laboratorio, si es que se van a trabajar de inmediato. El envío de las muestras de animales sospechosos pueden ser en congelación, nunca debe usarse conservadores porque pueden dar interferencia para el diagnóstico. Las secciones del tejido, hechas con el criostato, se tiñen con un conjugado anti-VFPC y se examinan con un microscopio de luz ultravioleta para observar de inmunofluorescencia. Las tonsilas son el tejido más importante para el diagnóstico; estudios de patogénesis revelan que la tonsila es el primer órgano en ser positivo, después de una exposición oral de 48 hrs. En orden decreciente el porcentaje de reactores positivos a: tonsila, íleon, hígado y riñón, muestran fluorescencia en 98, 71, 60 y 39 % de animales positivos respectivamente. En casos de enfermedades crónicas y subagudos, la parte

distal del ileon es frecuentemente encontrada como positiva y en algunas ocasiones es la única muestra que presenta inmunofluorescencia. La detección específica de fluorescencia en tejido (DEFT) es una técnica disponible y rápida para la demostración de antígenos vírales, fue una prueba aceptada oficialmente en programas nacionales e internacionales para la erradicación de la FPC en los EUA y en algunos países de la Comunidad Económica Europea. Sin embargo un resultado negativo, no excluye al virus de la FPC, por lo que se debe hacer un muestreo a los demás animales sospechosos (65,66,78,79)

La DEFT no diferencian a los antígenos de diferentes pestivirus; y hay resultados falsos positivos ante una infección por Diarrea Viral Bovina (DVB). Los cerdos vacunados con "cepas" de virus vivo modificado pueden dar una DEFT positiva a las 2 semanas después de la de vacunación. La inoculación de conejos es usada para diferenciar entre "cepas" Lapinizadas y "cepas" de campo del VFPC. En contraste, con las "cepas" de campo, las "cepas" Lapinizadas causan una reacción febril y una respuesta de anticuerpos en los conejos inoculadas por vía intravenosa (60,83)

El aislamiento del virus en cultivos celulares es el método de laboratorio más sensible para el diagnóstico de la FPC y esto puede revelar la presencia de pequeñas cantidades de virus. Para este propósito las células de PK-15 son ampliamente usadas. Los cultivos son teñidos con un conjugado inmunofluorescente y son examinados para detectar focos fluorescentes después de 24 a 72 hrs posinoculación. La técnica de exaltación del efecto citopático del virus de la Enfermedad de Newcastle (END), es usada en Japón como técnica de rutina. La prueba está basada en el aumento del efecto citopático del virus de la Enfermedad de Newcastle en células de testículo de cerdo en las cuales el virus ha sido replicado. La END es muy laboriosa y se emplea mucho más tiempo en comparación con la DIFT y es menos conveniente para la detección de "cepas" de virus de baja virulencia (45).

### **1.7.3 Detección de anticuerpos.**

#### **1.7.3.1 Reacción Inmunitaria.**

Los cerdos que se recuperan de la enfermedad, poseen anticuerpos contra la FPC. En comparación con otras infecciones vírales, los anticuerpos aparecen tardíamente en la circulación, demostrándose por las técnicas de neutralización, inmonufluorecencia indirecta, inmunodifusión, fijación del complemento, hemaglutinación pasiva, ELISA, Inmunoperoxidasa (IP), Western Blot. De estas pruebas, la prueba de neutralización es la más específica, ésta puede diferenciar entre anticuerpos del VFPC y los del VDVB. Sin embargo, los bajos títulos de anticuerpos neutralizantes para la FPC, pueden aumentar después de una infección con DVB. La prueba de neutralización es una prueba muy laboriosa, por lo que en los últimos años se desarrolló una prueba nueva que ha tenido un impacto importante; esta es la prueba de neutralización peroxidada ya que ahorra tiempo y puede ser aplicada en amplia escala (36,82).

También pueden ser producidos anticuerpos neutralizantes durante un curso subagudo de la FPC. Los cerdos con la FPC crónica, los cuales eventualmente mueren, también son capaces de montar una respuesta de anticuerpos específica, resultando una aparición simultánea de virus y anticuerpos en la sangre. Los fetos porcinos ganan inmunocompetencia alrededor de la mitad de gestación. Sin embargo, los anticuerpos neutralizantes específicos contra la FPC son formados únicamente en la fase terminal del desarrollo fetal (52,54,55,90).

Los cerdos con la FPC congénita persistente, raramente producen anticuerpos específicos. Cada cerdo tiene una respuesta inmunitaria normal hacia antígenos relacionados de la FPC y los casos de insensibilidad pueden ser explicados por tolerancia inmunológica específica a la FPC (96).

Ocasionalmente los cerdos infectados postnatalmente con la FPC, no muestran una respuesta de anticuerpos normales. Los anticuerpos neutralizantes pueden

ser detectados temporalmente o estar ausentes. Los cerdos infectados y sin anticuerpos neutralizantes pueden poseer anticuerpos detectables por otras pruebas. Una respuesta de anticuerpos anormales puede ser consecuencia de una pobre inmunogenicidad de las "cepas" del VFPC. Las "cepas" inmunogénicamente pobres, son usualmente de reducida virulencia. Los cerdos que producen una respuesta de anticuerpos normales hacia la FPC se encuentran inmunitarias a una infección subsecuente (7,19,43,96).

Las cerdas seropositivas transmiten anticuerpos por vía del calostro a sus crías. Por lo tanto los enterocitos inmaduros del intestino de los cerdos recién nacidos son permeables para las inmunoglobulinas en las primeras 36-48 hrs de vida y los anticuerpos contra el VFPC pueden entrar directamente a la circulación sanguínea. Los anticuerpos de origen materno tienen una vida media de aproximadamente 14 días. La inmunidad pasiva generalmente protege a los cerdos de la muerte durante las primeras 5 semanas de vida, pero no protege contra la replicación viral (80).

El significado de la inmunidad celular en la FPC no es conocido. Corthier y Remond detectaron una respuesta blastogénica transitoria, de linfocitos periféricos de sangre hacia los antígenos del VFPC en los cerdos infectados y vacunados (17,29,94).

La detección de anticuerpos específicos contra el VFPC es usada para demostrar la infección con "cepas" de baja virulencia. Como la respuesta de anticuerpos toma de 2 a 3 semanas para desarrollarse las muestras sanguíneas deben ser colectadas después de 3 semanas de haber estado en contacto con animales sospechosos. Las inspecciones serológicas pueden también ser útiles en la fase terminal de erradicación, para detectar infecciones en cerdas con crías. Varias técnicas ha sido descritas para este propósito (58).

Las técnicas de AGDT, DIIFT, la técnica modificada de Fijación del Complemento y la Hemaglutinación Pasiva no diferencian entre anticuerpos contra el VFPC y el

VDVB; los resultados positivos tienen que ser confirmados por la técnica de Neutralización Viral (VN) (58).

Mediante la VN se ha encontrado la incidencia de las infecciones de DVB en cerdos con crías en el oeste de Europa encontrándose que fueron positivos del 10 al 40%; esta técnica fue aprobada como el único método serológico válido en el programa de control y erradicación la FPC (58).

La prueba de neutralización fue desarrollada en cultivos celulares usando una cantidad constante de virus, contra diluciones variadas del suero. Debido a que este virus generalmente no causa efecto citopático, el virus no neutralizado se detectará únicamente hasta después de su multiplicación, mediante la prueba de inmunofluorescencia, el método de END o por el ensayo de inmunoperoxidasa. Ocasionalmente, el suero de los cerdos infectados con DVB puede reaccionar en diluciones bajas de la prueba de VN con el antígeno la FPC (42,50,67,82).

El grado de reacción cruzada depende de la "cepa" infectante de DVB, el intervalo entre la exposición y el muestreo, así como la "cepa" de FPC usada para realizar la prueba de neutralización. Los altos niveles de anticuerpos aumentan después de la exposición a "cepas" de baja virulencia de La FPC, permitiendo un aumento relativo de anticuerpos contra la FPC, por la prueba de VN (50,82).

### **1.8 Profilaxis y control.**

En los países libres de La FPC, existen medidas estrictas para prevenir la introducción del virus. La importación de los cerdos y el insuficiente cocimiento de la carne de puercos en productos y subproductos provenientes de países infectados con la FPC, deben ser prohibidas. Sumado a esto, los desechos de las cocinas de los aviones, barcos y trenes internacionales deben ser totalmente destruidos, como una medida general de precaución contra las enfermedades exóticas del ganado.

Cuando no se toman en cuenta las medidas anteriores y la enfermedad ya ha sido introducida, los policías veterinarios y medidas sanitarias, deben ponerse en acción y la llave del éxito dependerá de poder detectar rápidamente la fuente de infección, para así poder eliminar a este virus. Dependiendo de la situación local, las medidas tomadas pueden incluir una prohibición del movimiento de los cerdos, aumentando la vigilancia en las granjas afectadas y destruyendo todos los cerdos que se encuentren sospechosos de la enfermedad (medida que ha sido aplicada en algunos países), para evitar otro brote. La construcción de las granjas debe ser hecha de modo que puedan ser mantenidas limpias, no se debe permitir la entrada de ningún animal sospechoso, y se deben eliminar los cerdos sospechosos; antes de repoblar la granja es preferible utilizar cerdos centinelas, para asegurarse así de que ya que está libre de la enfermedad, necesitando una supervisión estricta (6).

La FPC ha sido erradicada en los países Escandinavos, Irlanda, El Reino Unido, Suiza, Australia, Canadá y de los EUA por eliminación total de los animales afectados, apoyado por medidas zoonosanitarias. Sin embargo en muchos países, la enfermedad se ha mantenido persistente por lo que se ha tenido que reforzar las medidas de control (95).

En una granja con producción intensiva, el movimiento a grandes distancias resulta un alto riesgo para adquirir esta enfermedad dentro de una área con alta densidad de cerdos por la alta diseminación del virus. El síndrome de la cerda portadora, la aparición de "cepas" de baja virulencia responsables de infecciones persistentes, inaparentes, y atípicas, han impedido el progreso hacia la erradicación final de esta enfermedad. Como resultado de estos factores epizootiológicos, los brotes frecuentemente son diagnosticados tardamente, después de que el virus se ha distribuido ampliamente (65).

Para romper con la perpetuación incontrolable del virus, la vacunación ha sido usada en gran escala, la cual ha ayudado para eliminar la enfermedad, o para

reducir el número de brotes, a un nivel que puede ser erradicado por medidas sanitarias (92).

Una de las medida más antigua es el método de la vacunación simultánea, donde el suero hiperinmunitaria-FPC y el virus virulento, eran inoculados en diferentes sitios. El método ha sido prohibido o abandonado en muchos países, ya que el uso del virus virulento contribuyó a la distribución mundial de la FPC. Las vacunas inactivadas con cristal violeta tienen una aplicación estrecha; esta vacuna, aunque generalmente segura, sólo proveía de protección reducida si se administraba dos veces, seguida de un refuerzo cada 6 a 12 meses; sin embargo, esta no protegió contra la multiplicación del virus y su distribución y el virus virulento puede ser recuperado regularmente de los fetos, cuando las cerdas vacunadas han sido desafiadas (37,68,91).

Las vacunas de virus vivo modificado (MLV) éstas ahora son preferibles por su mayor potencia. Algunas de las primeras vacunas de MLV atenuadas mediante pases en conejos (lapinizadas), poseían virulencia residual. La vacunación de los cerdos jóvenes era seguida de los signos clínicos de la FPC y la vacunación de las cerdas preñadas causaba la infección intraúterina de los fetos, provocando desordenes de la reproducción (25).

El uso de estas vacunas, por consiguiente fue prohibido en muchos países. Hace dos décadas fue posible, la vacunación con MLV "cepa" lapinizada China "C" sin virulencia residual; la vacuna adaptada a cultivos celulares de cuyes, "cepa" japonesa GPE- y la "cepa" Thiveral Francesa, adaptada a las células PK-15; después, las últimas dos "cepas" fueron clonadas y seleccionadas mediante su crecimiento a 30 °C (llamadas "cepas" frías). La primera y la última "cepas" son consideradas inocuas para las cerdas preñadas y para los lechones de dos semanas de edad. Ellas retienen sus propiedades atenuadas después de 20 a 30 pases en los cerdos susceptibles y proveen seguridad cuando son probadas en los cerdos inmunosuprimidos mediante el tratamiento con prednisolona. Estudios realizados con las "cepas" C y GPE, han mostrado que esos virus vacúnales se

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



replican en el tejido linfoide, especialmente en las tonsilas. La diseminación del virus vacunal de los cerdos vacunados a los susceptibles puestos en contacto, ha sido detectada con las tres "cepas" y no revierten a la virulencia bajo condiciones de campo, esto es debida a su estabilidad genética (2,31,39,65,72,73,86,87).

Las tres "cepas" MLV confieren una inmunidad rápida y perdurable. Los cerdos resisten al desafío después del 5° día de la vacunación y la inmunidad persiste por lo menos por 2 ó 3 años. Con respecto de los riesgos de usar la vacunación con MLV con una potencia inadecuada expresaron que los cerdos vacunados con la "cepa" C, con una dosis protectora para los cerdos del 50% (DPC<sub>50</sub>), o menos, pueden convertirse en portadores, y las cerdas preñadas pueden transmitir el virus de campo en forma horizontal, y por la vía de la placenta, al ser expuestas al VFPC virulento. Una mínima potencia de 100 DPC, fue recomendada. La descendencia de las cerdas vacunadas con la "cepa" C es protegida hasta las cinco semanas de edad, de la infección letal, pero no contra la multiplicación y distribución del virus. Estudios extensivos con vacunas modernas de MLV han mostrado que por lo menos 50% de los cerdos pueden ser vacunados con éxito a la edad de 6 semanas. La influencia supresiva de los anticuerpos maternos puede ser reducida utilizando una dosis vacunal incrementada y entonces ya pueden ser vacunados los cerdos recién nacidos, después de alimentarse del calostro (47,48,49,74,78,81).

La vacunación masiva de cerdos con aerosoles ha sido ensayada en el pasado con resultados variables. Muy recientemente ha sido informada la inmunidad satisfactoria en los cerdos expuestos a aerosoles de la "cepa" C propagada en cultivos celulares, aplicando la vacuna en cuartos con temperatura y humedad controlada (27,41).

La experiencia en Europa ha proveído dudas sobre si es posible erradicar la FPC de áreas enzoóticas, mediante régimen estricto y sistemático de vacunación aplicado por un largo tiempo y apoyando la vacunación con policías veterinarios y con medidas zoonitarias. Una buena conclusión que se ha obtenido es que los

regímenes no sistemáticos, o incompletos, basados en medidas meramente suplementarias para el control de la enfermedad, darán como resultado el que el número de brotes aumente, meses después de que la vacunación ha sido descontinuada. Para que la vacunación sea efectiva, ésta debe ser obligatoria y los animales vacunados deben ser identificados, para reconocerlos fácilmente, con un marcaje en la oreja. Debido al movimiento de los cerdos vacunados, tienden a ser reemplazados rápidamente por un lote de cerdos jóvenes no inmunitarios. Elementos significativos son el tipo de cerdo, el tipo de granja, la densidad de la población de los cerdos comerciales, el transporte, la presencia del virus en la cadena de alimentos, el grado de extensión (80).

Bajo ciertas condiciones una cerda preñada se puede infectar antes, o poco después de la vacunación, puede permanecer dando a la camada la leche infectada persistentemente. Aunque la camada infectada gradualmente sucumbirá a la FPC, la infección puede ser perpetuada subclínicamente algunas veces en los lechones, los cuales tienen menos inmunidad materna antes de comenzar la vacunación. Por estas razones, la vacunación complementaria debe ser continuada por lo menos durante un año después de empezar la campaña de una vacunación masiva. Se sabe que menos del 5% de los cerdos presentan resistencia natural (genética) a la FPC. La inmunidad puede ser adquirida en forma pasiva mediante la aplicación por vía parenteral de sueros hiperinmunitarios; o en los lechones recién nacidos, mediante la ingestión de calostro, procedente de las madres inmunitarias. La inmunidad adquirida en forma activa se puede inducir mediante la infección cuando los cerdos reciben dosis subletales del virus virulento o mediante la aplicación de vacunas, tales como: a) Virus vivo lapinizado (de alto y bajo pasaje); b) Virus vivo atenuado en cultivos celulares; c) Virus inactivado; d) Virus de la diarrea viral bovina (experimental) (10).

La primera forma de protección contra la FPC utilizada en los EUA, consistió en la aplicación de suero hiperinmunitaria. Posteriormente se utilizó la aplicación simultánea de suero hiperinmunitaria con virus virulento y se encontró que este método confería inmunidad estable y duradera. Sin embargo, este método tiene la desventaja de que difunde el virus virulento, razón por la que este tipo de inmunización fue el primero en ser discontinuado en los EUA, e incluso también en México (10).

Las vacunas de virus vivo poco atenuado lapinizado (de bajo pasaje) se recomendaba aplicarlas simultáneamente con suero hiperinmunitaria. Algunas de estas vacunas han sido obtenidas, únicamente mediante pases en conejos. Otras, mediante pases en conejos y en los cerdos; estas últimas son más patógenas. Algunas pueden llegar a producir inmunidad por dos años. Tienen la desventaja de que producen reacciones posvacunales, en ocasiones severas, que difunden el virus vacunal poco atenuado de los cerdos vacunados a los susceptibles puestos en contacto, y en esta forma el virus puede revertir a la virulencia, después de varios pases en los cerdos. Si se aplican sin suero, o *acompañadas de suero con potencia insatisfactoria, se puede producir de un 20%-40% de mortalidad* (10).

En varios países de Europa, Asia y América, se utiliza la vacuna de virus vivo lapinizado (de alto pasaje), "cepa" China, que de acuerdo con la literatura ha dado resultados altamente satisfactorios. Las vacunas de virus vivo atenuado mediante pases en cultivos celulares, pueden ser elaboradas en: a) líneas celulares de riñón de cerdo; b) células de riñón de bovino; c) leucocitos de cerdo, etc. En la práctica se prefiere a las vacunas preparadas en líneas celulares, libres de contaminantes, ya que los cultivos primarios pueden contener virus u otros agentes infecciosos. Estas vacunas son muy recomendables porque producen excelente inmunidad y de acuerdo con sus laboratorios productores, con algunas

de ellas no hay bloqueo sérico, ni bloqueo por anticuerpos maternos. Algunas se recomienda aplicarlas con suero hiperinmunitaria y otras sin suero. Algunas de estas vacunas vivas poco atenuadas tienen la desventaja de que se difunde el virus de los vacunados a los animales susceptibles puestos en contacto. Las vacunas inactivadas tienen la ventaja de que no difunden el virus. Sin embargo, se pueden encontrar lotes de vacunas mal inactivadas, que puede ocasionar brotes de la FPC. A partir de la tercera semana después de la vacunación, estimulan inmunidad que puede durar hasta 10 meses. Estas vacunas inactivadas son inefectivas si se aplican en combinación con suero, aunque hay controversias al respecto. Es preferible aplicarlas por vía subcutánea, porque por vía intradérmica son menos efectivas. Después de vacunar 3 veces a las madres, los lechones recién nacidos adquieren protección, a través del calostro, que les puede durar hasta las 13 semanas de edad. Es poco efectiva cuando se aplica a lechones de madres inmunitarias. Pero generalmente es efectiva en los cerdos mayores de 10 semanas de edad. Se prefiere aplicarla dos veces, con un intervalo de separación de 7 a 14 días. Los cerdos vacunados en esta forma, al ser expuestos con virus virulento, lo excretan durante el 2° y 5° día después de la exposición; y al aplicar tres vacunaciones se impide esta excreción de virus virulento. Se elaboran principalmente con sangre infectante desfibrinada, adicionada de cristal violeta (10,65).

En varias pruebas experimentales realizadas por Baker y cols. se encontró que el virus de diarrea viral bovina (BVD) "cepa" New York 1, protegió contra un gran número de "cepas" virulentas de la FPC, incluyendo 8 de las más virulentas colectadas por el Departamento de Agricultura de los EUA. En los cerdos SPF, protegió al 100% contra la "cepa" de explosión Ames. La "cepa" BVD-Andy 1 proviene de la BVD-NY 1, es una "cepa" que fue pasada 17 veces en los cerdos. No produce ninguna enfermedad en los cerdos y ha sido estudiada en México, en donde se encontró que protege contra el virus virulento Ames (83%). También se

ha estudiado en el INIP, SAGAR, México, la "cepa" vacunal PAV-250, obtenida en la Universidad de Cornell mediante 250 pases en cultivos celulares (3,6,11).

Esta vacuna tiene la ventaja de que, además de su alto índice de protección, no se difunde de los cerdos vacunados a los cerdos susceptibles puestos en contacto, según pruebas realizadas en cerdos. Esto la coloca en un plano superior a las existentes, que sí se diseminan. Las vacunas con esta característica son las elegibles para una campaña de erradicación basada en la vacunación extensiva, ya que al no difundirse, no se corre el riesgo de que reviertan a la virulencia. De modo que se puede incluso vacunar a los cerdos de una granja sin peligro de que aborten las hembras gestantes que estén en contacto con los vacunados. Al utilizar otras vacunas, poco atenuadas que sí se transmiten por contacto a las hembras gestantes susceptibles, se podrán presentar mortalidad de fetos; o algunos lechones de los que logren nacer vivos, podrán ser portadores del virus de la FPC, lo cual podría establecer focos de infección. También se ha estudiado en México, en pruebas de laboratorio, la vacuna PAV-250 combinada con la "cepa" DVB Andy 1, con resultados de 100% de protección; Lee y cols, 1988, estudió en Taiwán la "cepa" China (LPC) con excelentes resultados de inocuidad y protección. La "cepa" de DVB-NY 1, no es patógena para los cerdos (11,13,14,48).

La vacunación de las hembras gestantes es un tema delicado, puesto que la utilización de virus vivo, poco atenuado en el primer mes de la gestación, puede producir alteraciones en los productos, tales como: ascitis, edema subcutáneo en el mezocolon, edema subcutáneo y perirrenal, zonas de congestión en el hígado, asimetría de la cabeza, malformación de las patas y del morro y diseminación de virus virulento. Si se vacuna al final de la gestación pueden nacer lechones muertos, o bien, lechones débiles. Por otra parte la vacunación de las hembras gestantes con virus muerto puede realizarse en cualquier momento y no debe producir ningún problema, excepto cuando se utilizan lotes de vacunas mal

inactivadas y que por lo tanto podrán contener virus virulento; o lotes de vacunas con potencia insatisfactoria, que no inmunizaran (10,64).

En el INIP (ahora INIFAP, CENID-Microbiología-SAGARPA) se ha comprobado la potencia de diferentes tipos de vacunas y de sueros comerciales contra la FPC. Se estudiaron cinco vacunas de virus vivo atenuado, producidas en cultivos celulares, las cuales mostraron ser inocuas y con potencia satisfactoria (100%), por lo que fueron consideradas como recomendables. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que de acuerdo con las investigaciones de Philips los virus vivos vacunales poco atenuados, utilizados entonces, se transmitían de los cerdos vacunados a los cerdos susceptibles puestos en contacto. Por otra parte, las "cepas" poco atenuadas podrían ser peligrosas al vacunar hembras gestantes; e incluso para las hembras gestantes puestas en contacto con los vacunados con estas vacunas. Por otro lado, se ha comprobado que la vacuna PAV-250, no es patógena para las cerdas en gestación, o en celo (10,11,12).

Un lote estudiado de una vacuna lapinizada de bajo pasaje (aplicada sin suero) causó 100% de morbilidad y 90% de mortalidad. Los sobrevivientes resistieron perfectamente a la exposición con virus virulento. Este tipo de vacunas representa un peligro, porque se ha demostrado que independientemente de que los virus vacunales poco atenuados se apliquen con suero hiperinmunitaria o sin él, se diseminan de los cerdos vacunados a los cerdos susceptibles puestos en contacto. Algunos artrópodos también pueden contribuir a la diseminación del virus. Las vacunas lapinizadas de bajo pasaje que requieren ser aplicadas con suero hiperinmunitaria contra la FPC, tienen también la desventaja de que siempre se necesitará que existan laboratorios productores de suero hiperinmunitaria. Esto significa que siempre habrá focos de infección en los lugares donde sean producidos los sueros, puesto que para ello se requiere de utilizar grandes cantidades de virus virulento, el cual será inoculado en los cerdos que generalmente están a la intemperie. Por otra parte, inicialmente se probaron los sueros hiperinmunitarias contra la FPC de 4 diferentes laboratorios

comerciales y se encontró que 2 de ellos protegen 0%, mientras que los otros 2 producían un 90% de protección. Posteriormente, se repitieron las pruebas con otros lotes de uno de los sueros que protegió 0% y se encontró que después protegió al 40% y que la máxima protección que ofreció fue de 90%, lo cual aún está abajo del mínimo aceptable, que oficialmente es del 100%. Estudios posteriores realizados por Madrid y Correa (no publicado), con 3 diferentes sueros comerciales, dieron resultados similares (0, 14 y 89% de protección). Al estudiar un lote de una vacuna contra la FPC, inactivada con cristal violeta, se observó que produjo abscesos en el lugar de la inoculación y que confirió 0% de protección (10,64).

### 1.9. Vacunas.

Las vacunas que se han empleado para controlar los brotes de FPC en las diferentes épocas han sido clasificadas por generaciones (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Vacunas que fueron empleadas para el control de Fiebre Porcina clásica

Generación	Fecha	“cepa”	Inmunidad	Seguridad
Primera	1908-1936	Virus vivo virulento (sangre desfibrinada) más suero hiperinmunitaria	Rápida y Duradera	Baja, disemina
Segunda	1936-1956	Virus inactivado con cristal violeta	10 meses	Baja
Tercera	1960-1970	Virus de bajo pasaje en conejo (Lapinizada) o en conejo cerdo (origen cerdo)	Varios años	Baja
		Vacuna heterotípica de virus vivo de Diarrea Viral Bovina	Parcial	Baja
Cuarta	1968-1970	Virus modificado en leucocitos de cerdo (“cepa CJ”)	Parcial	Baja
Quinta	1975-1992	Virus inactivado	Parcial	Baja
Sexta	1962-1992	China, GPE, CI, CR20, Minesota, PAV-1, PAR-147, PAV-250	Variable de “cepa” a “cepa”	Seguras
Séptima	1075-1992	Thiverval	Varios Años	Segura

Adaptado de Ramírez y Reynoso (1993)(111)

### 1.10. “Cepas” vacunales permitidas en México.

Actualmente la SAGARPA ha establecido como única “cepa” permitida para la elaboración de las vacunas empleadas en la Campaña Contra la Fiebre Porcina Clásica, la “cepa” PAV-250 siendo la compañía “Productora Nacional De



Biológicos Veterinarios” una de las responsables de elaborar y distribuir dicha vacuna.

Las vacunas que se elaboran para ser empleadas en la Campaña Nacional Contra la Fiebre Porcina Clásica deben cumplir con las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-036-ZOO-1996 publicadas en el Diario Oficial de la Federación con fecha 29 de octubre de 1996 que se resumen a continuación:

Requisitos mínimos que deben cumplir las semillas de trabajo de las vacunas contra la Fiebre Porcina Clásica.

- El virus semilla de trabajo, debe estar libre de bacterias aerobias y anaerobias, mycoplasmas, hongos, levaduras, así como de cualquier otro agente biológico contaminante.
- El virus semilla de trabajo debe ser neutralizado por suero hiperinmunitaria mono-específico contra el virus de la FPC.
- El virus semilla de trabajo debe estar libre de virus de la Diarrea Viral Bovina y del virus de la Enfermedad de Aujeszky.
- El virus semilla de trabajo, después de ser aplicado en los cerdos, no se debe diseminar.

Requisitos mínimos que deben cumplir cada lote de vacuna antes de salir al mercado.

Las vacunas contra la FPC, ya sean importadas o producidas en el país, deben demostrar, por medio de pruebas de laboratorio, que cumplen con los siguientes requisitos mínimos:

- El 100 % de la muestra representativa del lote de vacuna debe tener vacío.

- El 100% de la muestra representativa del lote de vacuna liofilizada debe tener un porcentaje de humedad igual o menor al 4%.
- El lote o sublote de vacuna que no reúna los requisitos de vacío y humedad antes especificados debe exhibir en su etiqueta una fecha de caducidad de seis meses, contados a partir de la fecha de producción.
- La vacuna debe estar libre de bacterias aerobias y anaerobias, mycoplasmas, hongos, levaduras, así como de cualquier otro agente biológico contaminante.
- El virus vacunal debe ser neutralizado por suero hiperinmunitaria mono-específico contra el virus de la FPC.
- La vacuna debe estar libre de virus de la Diarrea Viral Bovina y del virus de la Enfermedad de Aujeszky.

Las pruebas se deben efectuar en el Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal y/o en un laboratorio aprobado por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural.

#### Pruebas "in vivo".

- El 0.01 (la centésima parte) de una dosis de vacuna debe proteger por lo menos al 80 % de los cerdos desafiados con una "cepa" virulenta del virus de la FPC, con un título de  $10^6$  DLC<sub>50</sub> %. Asimismo, cuando menos el 80% de los cerdos controles no vacunados, debe morir o enfermar de FPC durante el período de observación post-desafío: 14 días. En caso de que no enfermen o mueran el 80% de los cerdos testigos, la prueba debe repetirse.
- La vacuna no debe causar alteraciones en la salud de los cerdos vacunados con 5 dosis administradas en una sola aplicación.
- El 100 % de los cerdos que cohabiten con cerdos vacunados deben resultar negativos a la prueba de sueroneutralización-inteferencia viral para la detección de anticuerpos séricos contra el virus de la FPC.

- La prueba de cohabitación se realizará cada 20 lotes que provengan de la misma semilla de trabajo y en caso de constatación esporádica, cada seis meses.

## **2.0 Justificación.**

La Campaña de Erradicación contra la Fiebre Porcina Clásica se basa en la vacunación masiva y ha establecido que la vacuna PAV-250 es la vacuna única para la Campaña. Esto obliga a estudiar más de cerca la respuesta inmunitaria contra los antígenos de las cepas de campo y de la misma PAV-250, para que en un futuro se pueda establecer un método de diagnóstico que permita diferenciar a los animales vacunados de los infectados y así permitir la eliminación de los cerdos portadores asintomáticos de las piaras.

### **3.0. Objetivo general.**

Evaluar si existe o existen algunas diferencias en el reconocimiento de las proteínas de la cepa vacunal PAV-250 y de la cepa de campo VC-89-126 (de alta patogenicidad), para que sean identificadas en forma diferencial, tanto por los sueros de animales infectados con la cepa de campo como por los cerdos vacunados.

### **3.0.1 Objetivos particulares.**

1. Titular las cepas de campo y vacunal por la técnica de inmunoperoxidasa.
2. Purificar los virus (cepa de Campo y Vacunal).
3. Establecer la dosis "infectante" no letal para el virus de campo, para administrarla a los animales.
4. Establecer los patrones electroforéticos de las proteínas de la cepas de campo y vacunal de la FPC.
5. Evaluar el reconocimiento de las proteínas del virus de campo y del virus vacunal, mediante inmunotransferencia utilizando sueros de animales vacunados y/o infectados.
6. Evaluar la respuesta serológica de los animales vacunados y de los infectados con el virus de campo.

#### **4.0. Materiales y métodos.**

##### **4.1 Virus de la Fiebre Porcina Clásica utilizados.**

**Virus Vacunal.-** Se empleó la cepa vacunal PAV-250, lote 93-01 (proporcionada por los laboratorios Litton de México), producida en células PK-15.

**Virus de Campo.-** La cepa de campo VC-89-126, de alta patogeicidad, fue proporcionada por la Dra. Susana Mendoza Elvira. Esta cepa fue cultivada en células PK-15 las cuales fueron mantenidas con medio mínimo esencial (MEM) (Gibco) adicionado de suero fetal bovino libre del virus de DVB, infectándolas con 25 ml de MEM conteniendo virus con un título de  $10^{1.4}$  DICC/ml y se cosechó después de cuatro días de la inoculación. La cosecha consistió en romper las células por medio de congelación y descongelación, el proceso se repitió 3 veces. El virus cultivado se concentró por medio de liofilización. Ambos cultivos, virus vacunal y virus de campo, se titularon por la técnica de inmunoperoxidasa (IP). Ambos virus se distribuyeron en alícuotas que se emplearon: a) una parte para el desafío de los animales que recibieron tratamiento; b) otra parte se empleó para el establecer el patrón electroforético de los virus tanto de campo como vacunal y c) una tercera, parte para las pruebas de inmunotransferencias (101). La titulación se realizó por el Método de Reed y Muench (30)

##### **4.2 Determinación de la dosis inmunizante del virus de campo VC-89-126 productora de un período de incubación y de un curso largo de la enfermedad.**

En un ensayo se procedió a determinar en cerdos, la dilución de virus patógeno VC-89-126, que fuera capaz de producir la enfermedad, con un periodo de incubación largo, para así lograr que los cerdos inoculados alcanzaran a producir anticuerpos, antes de morir. Para llevar a cabo este estudio se emplearon 2 cerdos susceptibles a la FPC, de 45 días de edad, a los cuales se les administraron diluciones logarítmicas desde  $10^{-11}$  hasta  $10^{-1}$  y se les aplicó 1 ml a cada uno de los

cerdos, iniciando con la dilución más alta ( $10^{-11}$ ) hasta la dilución más concentrada ( $10^{-1}$ ). La administración de las diluciones hizo con un intervalo de tres días, por vía intramuscular, (IM) (Cuadro 3). A los cerdos se les registraron sus signos clínicos y su temperatura rectal hasta el día 38 postinoculación.

**Cuadro 3. Calendario para determinar la dosis inmunizante no letal del virus patógeno VC 89-126 de FPC.**

Día	Dilución administrada	Dosis*
1	$10^{-11}$	1 ml
3	$10^{-10}$	1 ml
6	$10^{-9}$	1 ml
9	$10^{-8}$	1 ml
12	$10^{-7}$	1 ml
15	$10^{-6}$	1 ml
18	$10^{-5}$	1 ml
21	$10^{-4}$	1 ml
24	$10^{-3}$	1 ml
27	$10^{-2}$	1 ml
30	$10^{-1}$	1 ml

\* Las dosis se administraron por vía intramuscular (IM)

#### 4.3. Formación de los grupos experimentales y los tratamientos empleados.

Se emplearon 28 cerdos de 45 días de edad, procedentes de una granja en la cual no se realiza vacunación contra la Fiebre Porcina Clásica (FPC). Los animales se distribuyeron en 5 grupos, cuatro grupos de cuatro cerdos experimentales y dos centinelas en los grupos A, B, C y E; y un quinto grupo formado solo por cuatro cerdos sin centinela, grupo D (Cuadro 4).



**Grupo A.-** Fue empleado como Grupo Control Positivo, ya que no recibió vacunación y sólo se inoculó con el virus de campo VC-89-126 al día 15 del experimento. El grupo fue formado por cuatro cerdos que recibieron la inoculación con el virus de campo VC-89-126 y dos cerdos que se emplearon como centinelas; los cuales permanecieron en contacto con los cerdos experimentales, de este grupo, durante todo el experimento.

**Grupo B.-** Recibió dos dosis de vacuna (2 ml) con el virus vacunal PAV-250, la primera al día uno y la segunda se aplicó a los 10 días. Se inoculó con el virus de campo VC-89-126 al día 15 del experimento. Este grupo fue formado por cuatro cerdos experimentales y dos cerdos centinelas.

**Grupo C.-** Recibió una sola dosis de vacuna con el virus vacunal PAV-250 (2 ml), el día uno y se inoculó con el virus de campo VC-89-126, el día 15 del experimento. El grupo fue formado por cuatro cerdos experimentales y dos cerdos centinelas.

**Grupo D.-** Este grupo no recibió ninguna dosis de vacuna con la cepa vacunal PAV-250, ni se le inoculó con el virus de campo VC-89-126. Este grupo fue formado con cuatro animales experimentales sin la presencia de centinelas.

**Grupo E.-** Este grupo recibió dos dosis de vacuna con la cepa vacunal PAV-250 (2 ml), la primera dosis el día uno y la segunda el día 10. No se le inoculó con el virus de campo VC-89-126. El grupo fue formado por cuatro cerdos experimentales y dos centinelas. Los tratamientos de los grupos se resumen en el Cuadro 4.

Los grupos de cerdos ya formados fueron alojados en unidades de aislamiento independientes y separadas con corrales individuales y cerrados para evitar el contacto entre los animales de cada grupo. Los grupos A, B y C, que recibieron la inoculación con el virus de campo VC-89-126, se mantuvieron en una sola área de aislamiento en corraletas individuales, y los grupos D y E, que no recibieron inoculación con el virus de campo VC-89-126, se mantuvieron en otra Unidad de Aislamiento. La alimentación y la limpieza de cada grupo fue realizada por personal diferente para cada unidad de aislamiento, con la finalidad de evitar la posible contaminación de los grupos por el mismo personal.

**Cuadro 4.- Distribución de los grupos experimentales y los tratamientos (vacunados, desafiados o sin tratamiento) que recibieron.**

GRUPO EXPERIMENTAL	VACUNACIÓN CON PAV-250 (2ml)		DESAFIO AL DIA 15 CON VC-89-126 $10^{-4}$ DICC <sub>50</sub> / ml
	Dosis al día 1	Dosis al día 10	
A	-	-	+
B	+	+	+
C	+	-	+
D	-	-	-
E	+	+	-

Los grupos A, B, C y E estuvieron formados por cuatro animales experimentales y dos centinelas y el grupo D se formó sólo de cuatro animales experimentales.

#### 4.4. Serología

A los animales se les tomó una muestra de sangre al momento de recibirlos, la cual se empleó para determinar que los animales fueran negativos al VFPC, por la técnica de inmunoperoxidasa. Posteriormente se les tomaron 7 muestras de sangre, a intervalos de 5 días, a partir del inicio del experimento. Las muestras de sangre se transportaron al laboratorio para ser centrifugadas a 1,500 xg/ 5 min. y separar el suero. Los sueros fueron almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su empleo posterior en las pruebas de inmunotransferencia. Los animales de todos los grupos fueron sacrificados a los 30 días de iniciado el experimento.

#### 4.5 Cuantificación de proteínas.

Los liofilizados fueron rehidratados en el menor volumen de agua (aproximadamente 1ml) destilada, tanto el virus de vacuna PAV-250 como el virus de campo VC-89-126. Además, se le determinó la concentración de proteínas a las muestras del medio de cultivo (Gibco BRL, Catálogo 41500-067), a suero fetal bovino (SFB) (Gibco BRL Catálogo, 16000-036) y a las células PK-15 no inoculadas; los monoestratos fueron lavados con PBS 1X estéril, para remover las

células muertas, las monocapas y su medio de cultivo fueron sonicadas durante tres periodos de tres minutos, a una velocidad de 60 ciclos por segundo. La técnica empleado para determinar la cantidad de proteínas en las muestras mencionadas fue por la técnica de Bradford, el cual consiste brevemente en:

Se preparó una solución estándar de albúmina sérica bovina, que contenía 100  $\mu\text{g/ml}$ . Se colocaron cantidades crecientes de la solución estándar de albúmina, desde 10 hasta 100  $\mu\text{l}$ , de tal manera que en el primer tubo había 10  $\mu\text{g}$  aumentado sucesivamente en los demás tubos hasta llegar a 100  $\mu\text{g}$  de proteína. Se colocaron 100  $\mu\text{l}$  de la muestra problema. Se preparó un tubo blanco con 100  $\mu\text{l}$  del disolvente en el cual se encontraba la muestra problema. A todos lo tubos se le adicionaron 5 ml del reactivo de Bradford, el cual se mezcló por inmersión. Después de 5 minutos de incubación, a temperatura ambiente, la lectura se realizó a 595 nm en un espectrofotómetro Beckman modelo DU64 (6). Las muestras fueron ajustadas a una concentración de entre 1 y 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

#### **4.6 Comparación del patrón electroforético de los virus estudiados.**

Para evaluar y comparar el patrón electroforético de cada uno de los virus en estudio, de FPC, se utilizaron los siguientes virus y controles: a) el virus vacunal PAV-250, b) el virus de campo VC-89-126, c) el medio de cultivo, d) células PK-15 no inoculadas (monocapas sonicadas) y e) suero fetal bovino.

Las electroforesis del virus de campo VC-89-126 y del virus vacunal PAV-250 se realizaron de acuerdo a la técnica de Laemmli (1970), en geles discontinuos de poliacrilamida, bajo condiciones reductoras, usándose el gel concentrador al 4% y el gel separador a una concentración del 12.5 % (46). En cada pozo del gel se le colocaron 15  $\mu\text{l}$  de la muestra y se realizo la corrida a una intensidad de corriente de 15 mA, por 2 horas, en una cámara Hoefer Scientific Instrument, modelo No SE250 y con una fuente de poder Hoefer Scientific Instrument modelo No PS250/25. Como control de peso molecular se empleó un marcador de peso molecular de amplio rango, el cual contenía las siguientes proteínas de peso

molecular conocido: miosina de músculo de conejo (205 Kd)  $\beta$ - galactosidasa de *E. coli* (116 Kd), fosforilasa b de músculo de conejo (97.4 Kd), albúmina sérica bovina (66 Kd), ovoalbúmina de huevo de gallina (45 Kd) y anhidrasa carbónica de eritrocitos de bovino (29 Kd).

Los geles se tiñeron con la técnica de Hitchcock y Brown (1983) empleando nitrato de plata como base de la tinción (35). Los geles ya preparados se colocaron en solución fijadora por toda la noche, una vez transcurrido el tiempo se retiraron de la solución fijadora y se lavaron tres veces con 500 ml de agua destilada por 30 minutos cada lavado. Después se preparó la mezcla de tinción, que consistió de: NaOH 0.1 M (30 ml), NH<sub>4</sub>OH al 34% (3 ml). Se agitó suavemente y se le adicionó gota a gota 1 g AgNO<sub>3</sub> disueltó previamente en cinco ml de agua destilada, con agitación suave, y por último se adicionaron 115 ml de agua destilada. Preparada la mezcla se colocaron dentro los geles y se dejaron por 30 minutos en esta solución. Transcurrido este tiempo se procedió a lavarlos tres veces, con 500 ml de agua destilada, por un minuto. El revelado de las bandas se realizó preparando una solución que contenía: ácido cítrico 0.05 g, formaldehído QP al 40% 1 ml y aforando con agua destilada a un litro. Los geles se dejaron en esta solución hasta la aparición de las bandas y la reacción se detuvo empleando una solución de 10 ml de ácido acético al 7%, en 200 ml de agua destilada, por una hora. Posteriormente se determinó la movilidad relativa (Rf) de cada banda observada, para determinar su peso molecular, en base a la ecuación de regresión lineal, usando como referencia las proteínas de peso molecular conocido mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Movilidad relativa} = \frac{\text{Distancia de migración de cada banda}}{\text{Distancia de migración del frente de corrida}}$$

#### **4.7 Electrotransferencias.**

Se prepararon geles de poliacrilamida al 12.5% (SDS-PAGE), empleando un peine continuo para el corrimiento de cada uno de los virus empleados (VC-89-126 y PAV-250), de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente.

Posteriormente que se realizaron las electroforésis, se cortaron pedazos de papel de nitrocelulosa (Inmobilon-P, Millipore ) de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ , del tamaño del gel y se coloca en un "cassett" del equipo de electrotransferencia (TE 22 Mihty Small Transphor, Hoefer Scintific Instrument, San Francisco, CA), el cual se preparó de la siguiente manera: se colocó el acrílico, luego la fibra, el papel filtro, el papel de nitrocelulosa, el gel, papel filtro, fibra y por último el otro acrílico; de tal manera que el cátodo quedó del lado del gel. El amortiguador de transferencia se preparó con Trisma base 25mM pH 8.3, glicina 0.192M, SDS 1% y metanol al 20%. Se conectó el sistema a la fuente de poder (EC-135 EC-Aparatus Corporation, St. Petesburgo, Florida). La transferencia se realizó a 30 V de corriente constante, durante toda la noche, con agitación continua (PCM- agitador magnético) y reflujo de agua fría. Al finalizar la transferencia se procedió a cortar el fragmento de papel, donde se encontraban los marcadores de peso molecular, además del extremo opuesto del papel y se tiñeron con solución de negro amido, para verificar que la transferencia se realizó de manera adecuada. El resto de papel se cortó en tiras de 2 mm de grosor, para emplearlas en las inmunotransferencias. Cuando no se realizaron las inmunotransferencias, al momento las tiras se enjugaron con agua destilada, se secaron y se almacenaron secas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.8 Tablero de ajedrez.**

Para conocer la dilución adecuada del suero y del anticuerpo anti-IgG de cerdo peroxidado, se realizó la prueba de tablero de ajedrez, para localizar la dilución optima de ambos. Se colocaron tiras con el antígeno viral, a las cuales se les aplicaron diluciones de suero, en sentido horizontal y las diluciones del anticuerpo

anti-IgG de cerdo en sentido vertical, de tal manera que la dilución de suero y de anti-IgG óptima, fue la dilución en la cual las bandas se apreciaron con claridad. Dichas diluciones fueron: para el suero problema de 1:40 y para el suero anti-IgG fue de 1.200.

#### **4.9 Inmunotransferencia.**

Para la realización de las inmunotransferencias se procedió de la siguiente manera: las tiras de papel con el antígeno viral se colocaron en placas con 8 carriles, se humedecieron previamente con solución de lavado durante 5 min. Se escurrieron sobre papel filtro retirando, la mayor cantidad de solución de lavado.

**Bloqueo de los espacios libres de las membranas.-** Cada tira fue bloqueada con 800 µl de amortiguador Tris-HCl, 0.1M, pH 7.4-Caseinato de calcio al 5%, en agitación suave por 30 min. a temperatura ambiente. Posteriormente fueron lavadas con 800 µl de amortiguador de Tris-HCl 0.1M pH 7.4-Tween 20 al 0.05%.

**Incubación con el anticuerpo primario.-** Los sueros de los animales se diluyeron 1:40 con amortiguador Tris-HCl 0.1M pH 7.4-Caseinato de calcio al 5% colocando, a cada una de las tiras, 800 µl de la dilución incubándolas por una hora con agitación moderada, a temperatura ambiente. En cada corrida se incluyeron controles, tanto positivos como negativos. Al terminar el tiempo de incubación, las tiras se lavaron 4 veces con 800 µl de amortiguador de Tris-HCl 0.1M pH 7.4-Tween 20 al 0.05%.

**Incubación con el anticuerpo secundario.-** A cada tira se le adicionó 800 µl del conjugado anti-IgG de cerdo, marcado con peroxidasa (Sigma Immuno Chemicals), diluido 1:200 en amortiguador Tris-HCl 0.1M pH 7.4-Caseinato de calcio al 5%; se incubó por una hora a temperatura ambiente con agitación suave después de lo cual se lavaron 4 veces con 800 µl de amortiguador de Tris-HCl 0.1M pH 7.4-Tween 20 0.05%. Adicionalmente se empleó otra serie de tiras para

**Revelado.-** Para demostrar la reacción entre los dos anticuerpos se preparó como sustrato, una solución con: 0.6 mg/ml de 4-cloro- $\alpha$ -naftol (Sigma C8890), peróxido de hidrógeno 0.015%, en amortiguador de trietanolamina 0.02 M pH 7.2. se adicionaron 800  $\mu$ l del sustrato a cada tira, se incubaron a temperatura ambiente con agitación, suave por 20 minutos hasta la aparición de las bandas y posteriormente se lavaron 4 veces con 800  $\mu$ l de amortiguador de Tris-HCl 0.1M pH 7.4-Tween 20 al 0.05% y se secaron al aire.

#### **4.10 Detección de glicoproteínas.**

Para detectar las glicoproteínas vírales, tanto de la cepa vacunal como de la cepa de campo, otro lote de tiras elaboradas en las electrotransferencias se lavaron 10 minutos en TBS, se retiró el TBS de lavado y se adicionó la solución de Concanavalina-A marcada con peroxidasa (Sigma) a una concentración de 10  $\mu$ g/ml, diluida en amortiguador Tris-HCl 0.1M pH 7.4-Caseinato de calcio al 5%. Se incubó por una hora a temperatura ambiente, con agitación suave, después de lo cual se lavaron 4 veces con 800  $\mu$ l de amortiguador de Tris-HCl 0.1M pH 7.4-Tween 20 0.05%. y se adicionó la solución de revelado.

**Revelado.-** Se preparó, como sustrato, una solución con: 0.6 mg/ml de 4-cloro- $\alpha$ -naftol (Sigma C8890), peróxido de hidrógeno 0.015%, en amortiguador de trietanolamina 0.02m pH 7.2. Se adicionaron 800  $\mu$ l del sustrato a cada tira, se incubaron a temperatura ambiente, con agitación suave, por 20 minuto hasta la aparición de las bandas y posteriormente se lavaron 4 veces con 800  $\mu$ l de amortiguador de Tris-HCl 0.1M pH 7.4-Tween 20 0.05% y se secaron al aire.

#### **4.11 Detección de anticuerpos contra *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Pasteurella multocida*.**

Para detectar anticuerpos en contra de *A. pleuropneumoniae* y contra *P. multocida* se empleó el equipo de diagnóstico PLEUROTTEST y PASTEUROTTEST.

La prueba consistió en colocar 5 gotas del suero problema y adicionar una gota de cada antígeno, de los serotipos 1, 3, 5, y 7 de *A. pleuropneumoniae* y por separado para *P. multocida* mezclaron con un aplicador de madera, se agita por 2 minutos con movimientos ondulatorios y se realizó la lectura, dando como resultado positivo cualquier grado de aglutinación.

#### **4.12 Detección de antígenos contra el Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) y contra el Virus de la Enfermedad de la Frontera (VBD).**

Para intentar detectar los antígenos contra el Virus de Diarrea Viral Bovina y contra el virus de la Enfermedad de la Frontera se procedió de igual manera que para las inmunotransferencias sólo que en lugar del suero problema se empleó como control un suero hiperinmune contra estos dos virus y se reveló de la misma manera.



## **5.0. Resultados**

### **5.1. Virus de la FPC**

El título obtenido por la técnica de inmunoperoxidasa, para el virus vacunal PAV-250, fue de  $1 \times 10^{3.8}$  TCID<sub>50</sub>/0.2 ml, mientras que para el virus de campo VC-89-126 el título fue de  $1 \times 10^{3.4}$  TCID<sub>50</sub>/0.2ml.

### **5.2. Determinación de la dosis mínima infectante productora de un período de incubación y curso largo del virus de campo VC-89-26.**

Durante el ensayo preliminar hecho con los cerdos que fueron inoculados con diluciones cada vez más concentradas del virus de campo VC-89-126, estos manifestaron elevación de la temperatura rectal a partir del día 24 de iniciado el protocolo de inmunización, a los cuatro días posteriores a la administración de la dilución  $10^{-3.0}$  y a los siete días de la dilución  $10^{-4.0}$ , ambos cerdos presentaron los signos clínicos de la FPC, los cuales fueron: elevación de la temperatura, anorexia, postración, hacinamiento, pelo hirsuto, signos nerviosos, movimientos tónicos clónicos, parpadeo continuo, congestión de la conjuntiva ocular, flancos hundidos. Uno de ellos murió el día 30 y el otro mostró diarrea, hipotermia y murió a los 38 días de iniciado el protocolo. En base a los resultados obtenidos se determinó usar la dosis de  $10^{-4.0}$  /ml para inocular a los cerdos de la etapa siguiente.

### **5.3. Signología.**

Durante el transcurso del experimento en los animales inoculados se observaron los signos clínicos mencionados a continuación:

**Grupo A.-** Este Grupo se formó por 4 cerdos experimentales y 2 cerdos centinelas. Sólo los cerdos experimentales de este grupo recibieron la

inoculación con el virus de campo VC-89-126 el día 15 del experimento. La anorexia se presentó tanto en los cerdos experimentales como en los centinelas, a los tres días posteriores a la inoculación de los 2 ml del virus de campo (cepa VC-89-126). Dos de los cerdos experimentales alcanzaron temperaturas rectales de 41 °C o más; sin embargo, estos cerdos que presentaron la temperatura más alta, murieron a los 19 y 20 días de iniciado el experimento. En los cerdos centinelas de este grupo la temperatura rectal se incrementó hasta los días 21 y 22 (día 11 y 12 postinoculación) del experimento y no rebasó la temperatura reportada en la literatura. La diarrea se presentó en dos de los cerdos experimentales y en los dos centinelas; presentándose en los cerdos experimentales al día 20 del experimento (día 10 postinoculación) y en los cerdos centinelas al día 25 del experimento (día 15 postinoculación). Dos de los cerdos experimentales y uno sólo de los centinelas presentaron vómito, el cual se registró simultáneamente a la diarrea. La incoordinación muscular que presentaron los cerdos de este grupo se registró al día 20, para los cerdos experimentales y al día 25 para los cerdos centinelas (día 10 y 15 postdinoculación). La parálisis del tren posterior se presentó posterior a la incoordinación muscular, la cual se caracteriza por la pérdida de la movilidad de las extremidades posteriores de los animales, lo que les impide ponerse en pie. Las convulsiones se observaron en todos los cerdos, tanto experimentales como en los centinelas, a partir del día 20 y 25 respectivamente del experimento (Día 10 y 15 postinoculación). Este signo se presentó en todos los cerdos experimentales al día 25 y en uno solo de los centinelas al día 28 del experimento (día 15 y 18 postinoculación).

**Grupo B.-** Este Grupo estuvo formado por 4 cerdos experimentales y 2 centinelas. Los cerdos experimentales recibieron dos dosis de vacunación, los días 1 y 10 del experimento y la inoculación del virus de campo VC-89-126 el día 15 del experimento.

Los cerdos experimentales de este grupo no presentaron anorexia durante todo el experimento; sin embargo, los dos cerdos centinelas presentaron anorexia a los cinco días posteriores a la inoculación de los cerdos experimentales con 2 ml de

virus de campo de la cepa VC-89-126. En los dos cerdos centinelas se presentó un ligero aumento en la temperatura durante los últimos tres días, la fiebre fue de 41 a 42 °C (días 27 al 30 del experimento, días 17 al 20 postinoculación). Los cerdos experimentales no presentaron elevación de temperatura en el transcurso del experimento. En los cerdos experimentales no se presentó diarrea, en los cerdos centinelas esta se presentó al día 25 del experimento (día 15 postinoculación). El vómito no se presentó en los cerdos experimentales; sin embargo, en los cerdos centinelas si se presentó vomito el cual se registró después de iniciada la diarrea. Los cuadros nerviosos y convulsiones, tales como incoordinación muscular y parálisis del tren posterior no se presentó en los cerdos experimentales, estos signos si se presentaron en los cerdos centinelas a partir del día 25 del experimento (día 15 postinoculación).

**Grupo C.-** El Grupo se formó con 4 cerdos experimentales y 2 centinelas. Los cerdos experimentales recibieron una sola dosis de vacuna el día 0 del experimento.

La anorexia no se presentó en los cerdos experimentales, está sólo se presentó en los centinelas día 25 del experimento (día 15 postinoculación). La elevación de la temperatura rectal sólo se presentó en los cerdos centinelas, la cual se incrementó hasta los días 25 y 29 del experimento (día 15 y 19 postinoculación); en ambos casos la temperatura rectal rebasó la reportada en la literatura (41 °C), pero esta elevación sólo se observó por tres días en un de los cerdo y en el otro solo fue observada por un día. La diarrea se presentó en los dos centinelas, presentándose al día 26 del experimento (día 16 postinoculación). El vómito sólo se presentó en los cerdos centinelas, después de iniciada la diarrea. Los signos nerviosos tales como; incoordinación muscular, parálisis del tren posterior y convulsiones, sólo se presentó en los cerdos centinelas, a partir del día 27 del experimento (día 17 postinoculación).

**Grupo D.-** Este Grupo se formó sólo de 4 cerdos experimentales que no recibieron ningún tratamiento. Sólo se les aplicó solución salina fisiológica, en lugar de las dosis de vacuna PAV-250 y de la inoculación del virus de campo VC-89-126.

En este Grupo no se presentaron los signos clínicos característicos de Fiebre Porcina Clásica

**Grupo E.-** Este Grupo se formó por 4 cerdos experimentales y por 2 centinelas. Los cerdos experimentales recibieron dos dosis de vacuna PAV-250, los días 1 y 10 del experimento, sin recibir la inoculación del virus de campo VC-89-126. En este Grupo no se presentaron los signos clínicos característicos de Fiebre Porcina Clásica.

Los cerdos de todos los grupos que sobrevivieron fueron sacrificados a los 30 días de iniciado el experimento. Los signos clínicos observados en los grupos experimentales se resumen en el Cuadro 5.

**Cuadro 5.- Signos clínicos observados en los grupos experimentales.**

Signos clínicos	Grupo experimental				
	A No Vacuna Si desafió	B 2 D vacuna Si desafió	C 1 D vacuna Si desafió	D No vacuna No desafió	E 2 D vacuna No desafió
Anorexia	*4/4 **2/2	0/4 2/2	0/4 2/2	0/4	0/4 0/2
Hipertermia	0/4 0/2	0/4 0/2	0/4 0/2	0/4	0/4 0/2
Diarrea	2/4 2/2	0/4 2/2	0/4 2/2	0/4	0/4 0/2
Vómito	2/4 1/2	0/4 2/2	0/4 2/2	0/4	0/4 0/2
Convulsiones	4/4 2/2	0/4 2/2	0/4 0/2	0/4	0/4 0/2
Incoordinación muscular	4/4 2/2	0/4 2/2	0/4 2/2	0/4	0/4 0/2
Parálisis del tren posterior	4/4 1/2	0/4 2/2	0/4 0/2	0/4	0/4 0/2
Depresión	4/4 2/2	0/4 1/2	0/4 0/2	0/4	0/4 0/2
Secreción ocular	1/3 1/2	0/4 0/2	0/4 0/2	0/4	0/4 0/2
Apilamiento	4/4 2/2	0/4 0/2	0/4 0/2	0/4	0/4 0/2
Pérdida de peso	2/4 2/2	0/4 1/2	0/4 0/2	0/4	0/4 0/2
Postración	4/4 2/2	0/4 2/2	0/4 1/2	0/4	0/4 0/2
Temblor muscular	4/4 2/2	0/4 1/2	0/4 0/2	0/4	0/4 0/2
Muerte	3/4 1/2	0/4 0/2	0/4 0/2	0/4	0/4 0/2

\*X/4 = cerdos experimentales; \*\*X/2 = cerdos centinelas; No Vacuna = Sin administración de dosis de vacuna; Si desafío = inoculación con la cepa de campo VC-89-126; No Desafió= No se inoculo con cepa de campo VC-89-126; 2D vacuna = Se administraron dos dosis de vacuna PAV -250; 1 D vacuna = Se administró una dosis de Vacuna PAV -250.

#### 5.4. Hallazgos a la necropsia

Después del sacrificio de los animales se procedió a realizar la necropsia, buscando las lesiones macroscópicas características de la enfermedad, como fueron: petequias en riñones y vejiga, piel cianótica, infartos en el bazo, úlceras en válvula ileocecal y otras lesiones.

**Grupo A.-** Los cerdos experimentales de este Grupo sólo recibieron la dosis de desafío el día 15 del experimento.

La inflamación de los nódulos linfáticos acompañada de hemorragias y edema, sólo se observaron en uno de los cerdos centinelas. Todos los cerdos experimentales presentaron petequias en los riñones, desde escasas hasta abundantes, principalmente en los cerdos que duraron más tiempo con la enfermedad; en 2 de los cerdos experimentales se presentaron hemorragias en la vejiga y en uno de los cerdos centinelas se presentaron petequias en los riñones y hemorragias en la vejiga. La piel cianótica se presentó en todos los animales del Grupo principalmente en las orejas, abdomen y extremidades, tanto anteriores como posteriores. Los infartos en el bazo se presentaron en todos los cerdos, tanto experimentales como centinelas, el tamaño de los infartos fue variable presentándose desde pequeños y escasos hasta grandes y abundantes, siendo más característicos en los cerdos centinelas. Todos los cerdos presentaron ulceración alrededor de la válvula ileocecal, en uno de los cerdos centinelas, además se encontraron ulceraciones en el intestino y áreas de congestión. En los 4 cerdos experimentales y en uno de los centinelas se observaron lesiones pulmonares sugestivas de neumonías por *Actinobacillus pleuropneumoniae* y/o *Pasteurella multocida*, por lo cual se realizaron pruebas serológicas para tratar de determinar si estos microorganismos estaban involucrados (Cuadro 7).

**Grupo B.-** El Grupo estuvo formado por 4 cerdos experimentales y 2 centinelas. Los cerdos experimentales recibieron dos dosis de vacunación los días 0 y 10 del experimento y la dosis de desafío el día 15.

En los cerdos experimentales no se observaron nódulos linfáticos hemorrágicos y con edema; este tipo de lesión, sólo se observó en uno de los cerdos centinelas encontrándose en los ganglios linfáticos submaxilares, los cuales estaban inflamados e infartados. Sólo uno de los cerdos experimentales y los dos cerdos centinelas presentaron escasas petequias en los riñones a nivel subcapsular. Ninguno de los cerdos del Grupo presentó piel cianótica ni infartos en el bazo. La válvula ileocecal e intestino con ulceraciones sólo se observó en uno de los cerdos centinelas, observándose ulceraciones botonosas rodeando la válvula ileocecal con escasas lesiones en el intestino. La lesiones pulmonares sólo se observaron en uno de los cerdos centinelas, como focos hemorrágicos en el lóbulo apical izquierdo.

**Grupo C.-** El grupo se formó por 4 cerdos experimentales y 2 centinelas. Los cerdos experimentales recibieron una sola dosis de vacuna el día 1 del experimento. Sólo uno de los cerdos centinelas presentó los ganglios submaxilares ligeramente inflamados, con escasas hemorragias. En los riñones de uno de los cerdos centinelas se observaron petequias a nivel subcapsular. La piel cianótica, infarto en bazo válvula ileocecal e intestino con ulceraciones no se observó en los cerdos de este Grupo. Las lesiones pulmonares que se observaron en el cerdo centinela fueron lesiones neumónicas hemorrágicas.

**Grupo D.-** Este grupo se formó solo de 4 cerdos experimentales, no recibieron ningún tratamiento, ni se observaron lesiones macroscópicas a la necropsia

**Grupo E.-** Este Grupo se formó por 4 cerdos experimentales y 2 centinelas. Los cerdos experimentales recibieron dos dosis de vacunación los días 0 y 10 del experimento sin recibir dosis de desafío. En este grupo no se observaron lesiones macroscópicas a la necropsia.

Las lesiones macroscópicas de todos los grupos se resumen en el Cuadro 6.

**Cuadro 6.- Lesiones macroscópicas observadas a la necropsia en los grupos experimental.**

Lesión	Grupo experimental				
	A No Vacuna Si desafió	B 2 D vacuna Si desafió	C 1 D vacuna Si desafió	D No vacuna No desafió	E 2 D vacuna No desafió
Nódulos linfáticos hemorrágicos y con edema	*0/4 **1/2	0/4 2/2	0/4 1/2	0/4	0/4 0/2
Riñones y/o vejigas con petequias y hemorragias	4/4 1/2	1/4 2/2	0/4 1/2	0/4	0/4 0/2
Piel cianótica	4/4 2/2	0/4 0/2	0/4 2/2	0/4	0/4 0/2
Infartos en el bazo	4/4 2/2	0/4 0/2	0/4 0/2	0/4	0/4 0/2
Válvula ileocecal e intestinos con úlceras	4/4 2/2	0/4 1/2	0/4 0/2	0/4	0/4 0/2
En el tracto respiratorio	4/4 1/2	0/4 1/2	0/4 1/2	0/4	0/4 0/2

\*X/4 = cerdos experimentales; \*\*X/2 = cerdos centinelas; No Vacuna = Sin administración de dosis de vacuna; Si desafío = inoculación con la cepa de campo VC-89-126; No Desafió= No se inoculo con cepa de campo VC-89-126; 2D vacuna = Se administraron dos dosis de vacuna PAV -250; 1 D vacuna = Se administró una dosis de Vacuna PAV -250.

### 5.5. Detección de anticuerpos contra *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Pasteurella multocida*.

Por otro lado en la necropsia se observaron lesiones a nivel pulmonar sugestivas de neumonías causada por *A. pleuropneumoniae* y *P. multocida* por lo que se decidió tratar de detectar anticuerpos contra estos agentes patógenos.

**Grupo A.-** En este grupo solo se registró anticuerpos contra el serotipo 1 de *A. pleuropneumoniae* en 2 de los cerdos experimentales y en uno de los cerdos centinela. Los cerdos experimentales en 3 se detectaron anticuerpos contra *P. multocida* y en uno de los cerdos centinelas.



**Grupo B.-** No se registraron anticuerpos contra *A. pleuropneumoniae* en los cerdos experimentales y centinelas. Los 4 cerdos experimentales presentaron anticuerpos en contra de *P. multocida*,

**Grupo C.-** Sólo uno de los cerdos presentó anticuerpos en contra del serotipo 5 de *A. pleuropneumoniae*. Los 4 cerdos experimentales y uno de los centinelas fueron positivos a anticuerpos contra *P. multocida*.

**Grupo D.-** En este Grupo formado sólo por 4 cerdos experimentales sólo se resultaron positivos 2 de los cerdos a *P. multocida*.

**Grupo E.-** Sólo uno de los cerdos experimentales dio positivo a la prueba contra el serotipo 5 de *A. pleuropneumoniae*. Uno de los centinelas dio positivo al serotipo 1 y los dos dieron positivos al serotipo 5 de *A. pleuropneumoniae*. Contra *P. multocida* uno de los cerdos experimentales y los dos centinelas dieron resultado positivo.

Los resultados de la serología se resumen en el Cuadro 7.

**Cuadro 7.-Resultados de la serología de los grupos experimentales.**

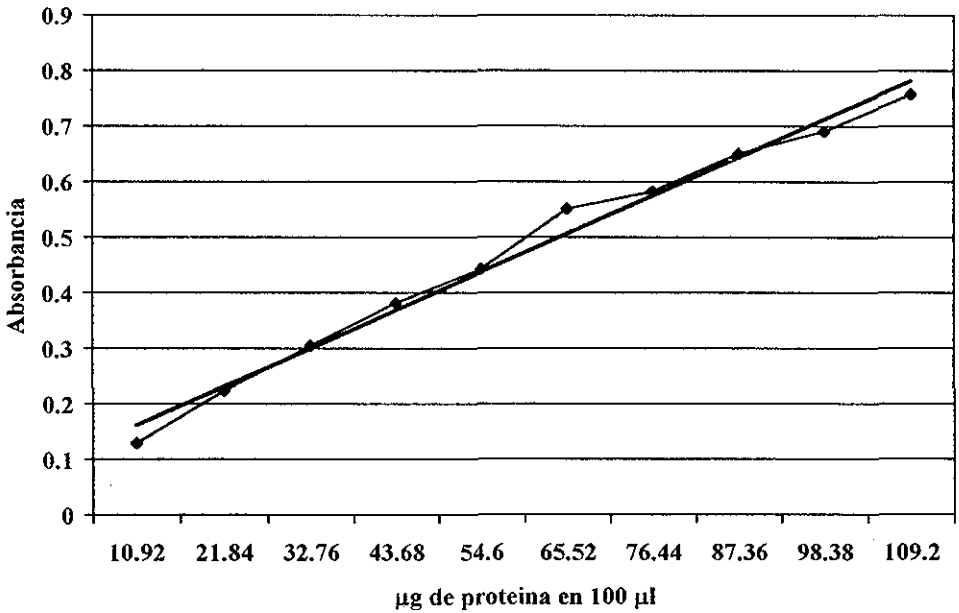
Grupo	<i>A. pleuropneumoniae</i>				<i>P. multocida</i>
	1	3	5	7	
A No Vacuna	2/4	0/4	0/4	0/4	3/4
Si desafió	1/2	0/2	1/2	0/2	1/2
B 2 D vacuna	0/4	0/4	0/4	0/4	4/4
Si desafió	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
C 1 D vacuna	0/4	0/4	1/4	0/4	4/4
Si desafió	0/2	0/2	0/2	0/2	1/2
D No vacuna	0/4	0/4	0/4	0/4	2/4
No desafió					
E 2 D vacuna	0/4	0/4	1/4	0/4	1/4
No desafió	1/2	0/2	2/2	0/2	2/2

\*X/4 = cerdos experimentales; \*\*X/2 = cerdos centinelas; No Vacuna = Sin administración de dosis de vacuna; Si desafió = inoculación con la cepa de campo VC-89-126; No Desafió= No se inoculo con cepa de campo VC-89-126; 2D vacuna = Se administraron dos dosis de vacuna PAV -250; 1 D vacuna = Se administró una dosis de Vacuna PAV -250.

### 5.6. Cuantificación de proteínas.

Basándose en la curva estándar se determinó que la cepa de campo VC-89-126 tenía una concentración de proteínas de 1.44  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  y que la vacuna preparada con la cepa PAV-250 contenía 1.65  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (Gráfica 1).

**Gráfica 1.- Curva estándar de proteínas. Para ésta curva se empleo albúmina sérica bovina a una concentración de 1.096  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$**



$$r = 0.9941$$

$$r^2 = 0.9885$$

$$b = 0.00637$$

$$m = 0.0920$$

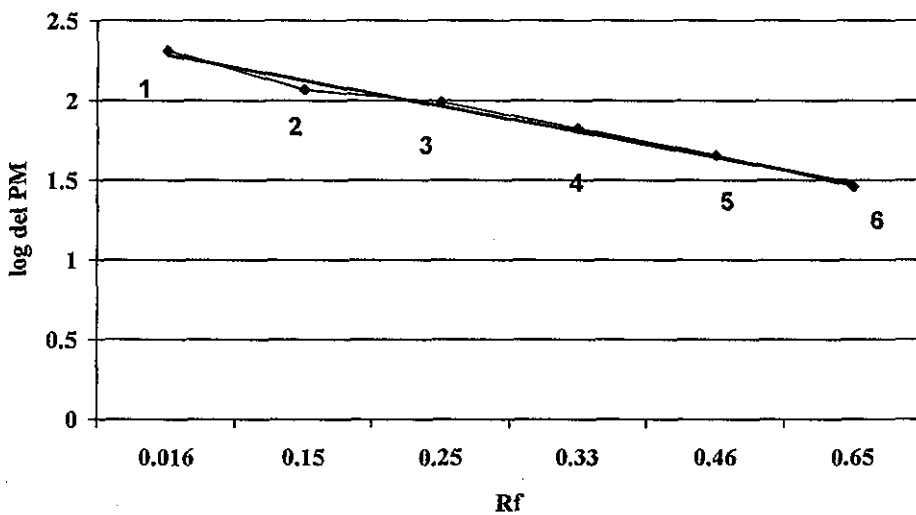
## 5.7. Patrón electroforético de las cepas.

Una vez realizada la electroforesis se determinó el peso molecular de cada banda proteica, interpolando los valores de movilidad relativa ( $R_f$ , Gráfica 2) de cada banda, en la curva estándar formada por los pesos moleculares. En el gel se incluyó un lisado de células, ya que no se pudo realizar la purificación de los virus y se descartaron todas las bandas de ambos virus que coincidieran con el peso molecular de alguna de las proteínas del lisado de las células.

En el virus de campo VC-89-126 se detectaron 2 proteínas con pesos moleculares de 195 y 258 Kd, que no se observaron en el virus de vacuna PAV-250; la proteína con peso molecular de 145 (PAV-250) y 151 (VC-89-126) se puede considerar una misma, así como las de 113 y 108, ya que la variación de 5 Kd es mínima. Otras de las proteínas que se encontraron en una de las cepas fueron 2 proteínas de 75 y 68 que sólo se registraron en la cepa vacunal PAV-250 y que no se detectaron en la cepa de campo VC-89-126. Las proteínas de bajo peso molecular que sólo se presentaron en la cepa de campo son las 3 proteínas de 31, 29 y 7 Kd.

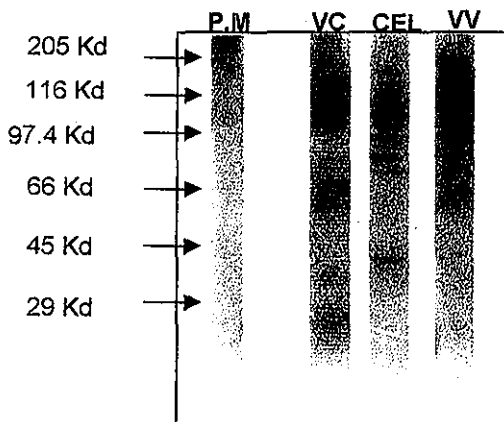
El gel correspondiente a la electroforesis de la cepas vacunal y virus de campo se muestra en la Figura 2 y el resumen de los pesos moleculares de las proteínas de ambos virus se muestran en el Cuadro 8.

Grafica 2.- Curva estándar de pesos moleculares para el patrón electroforético y la prueba de inmunotransferencia. (1= Miosina de músculo de conejo, 2=  $\beta$  Galactosidasa de *E. Coli*, 3= Fosoforilasa B de músculo de conejo, 4= Albumina sérica bovina, 5= Ovoalbumina de huevo de gallina, 6= Anhidrasa carbónica de eritocitos de bovino.



$$R = -0.9938 \quad r^2 = 0.9878 \quad b = 2.2985 \quad m = -1.3349$$

Figura 3- Patrón electroforético del virus de campo VC-89-126 (VC), el lisado de células PK-15 con suero fetal Bovino (CEL) y la cepa vacunal PAV-250 (VV) teñido con la técnica de nitrato de plata.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Cuadro 8.- Proteínas del virus de la Fiebre Porcina Clásica reportadas en la literatura y presentes en las cepas PAV-250 y VC-89-126.**

PROTEÍNAS REPORTADAS EN LA LITERATURA				DETECTADAS EN EL PRESENTE TRABAJO.	
Referencia	P.M.	Mendoza 1995		"capa" PAV-250	"cepa" VC-89-126
		"cepa" PAV-250	"cepa" VC-89-126		
NR, EE		252.6 248.7	257.8		258.3
NR, EE			231.1		
NR, EE		121.7			
NR, EE		203.9	209.1 107.5		
NR, EE		187.3 183.2	188.8		194.77
NR, EE			174.8		
NR, EE		169.8	169.5		
NR, EE			154.6		
NR, EE			152.3		151.68
NR, EE		141.9	143.1	145.47	
NR, EE		139.9	131.5		
33	125		128.7		
8, 22, 63, 102	120 118 116 115		121.6 117.0 113.5	113.29	
62	110	110.9 106.7	108.5		108.70
NR, EE		102.8	105.7 103.8		
38, 62, 102	97 93-90	97.4 95.7 91.3	95.7 92.3	99.98	
102	89-87	87.2	89.6	88.40	88.27
65	84	84.0 81.1	82.4		
8, 23, 29, 33, 38, 62,63	80 75 70-69 65 62		79.8 74.3	74.69	
		66.6 60.4		68.24	

8, 22, 51, 59, 63, 69, 71, 85, 102, 103.	65-56 58-51 57 55-53 53-54 51	54.5	57.0 55.1	60.65     51.34	     51.34
8, 23, 85, 99, 102.	48 48-44 47		49.2		
38, 51, 63, 102.	46-44 45				43.47
102.	42-39				
102	38		37.9		36.5
85, 101, 102.	42-31 35-32 33		35.0 33.5	33.84	34.2
29, 38, 102.	31 30		30.6 30.5		31.3
102	27-24	29.4 28.0 27.5	26.8 26.0		28.65
62	26-25		24.2		
62, 70, 71.	24-23	23.8	23.0 21.4		
85, 102.	31-19 19 14	20.5		18.11	12.45

NR = No Reportadas; EE = Encontradas Experimentalmente

### 5.7. Electrotransferencias.

Una vez realizada la electrotransferencia se comprobó que las proteínas fueran transferidas al papel de nitrocelulosa, cortando los extremos de las tiras donde se encontraban los pesos moleculares y una fracción del papel que contuviera los antígenos tanto vacunales como de campo y se tiñeron con la solución de negro amido para posteriormente colocarlos junto a las tiras que reaccionaron con los anticuerpos de los sueros problema.

### **5.9. Tablero de ajedrez.**

Una vez realizado el tablero de ajedrez, para determinar la dilución óptima del suero problema, así como del antisuero anti-IgG de cerdo marcado con peroxidasa, se determinó que la dilución adecuada del suero problema era la de 1:40 y la del suero marcado con peroxidasa fue de 1:200.

### **5.10. Inmunotransferencia.**

Con las tiras recortadas de 2 mm de grosor se realizaron las inmunotransferencias. Los sueros se trabajaron simultáneamente con el antígeno de campo y con el vacunal, para tratar de encontrar alguna diferencia entre ambos antígenos.

**Grupo A.-** Los cerdos experimentales presentaron respuesta de anticuerpos en contra de las proteínas del antígeno de campo VC-89-126, principalmente en los muestreos del tercero al quinto detectándose proteínas con diferentes rangos de peso molecular, que fueron desde los 28 hasta los 198 Kd, siendo variable la respuesta de cerdo a cerdo, ya que en algunos de ellos se detectaron respuestas contra 8 proteínas, mientras que en otros sólo se detectaron 2 proteínas.

La respuesta de los cerdos centinelas se presentó hasta el quinto sangrado, siendo más marcada sólo en uno de los cerdos, ya que en el otro sólo hubo respuesta en contra de una sola proteína en el sexto sangrado. El resumen de las proteínas detectadas por inmunotransferencia se ilustra en el Cuadro 9 y en la Figura 4

**Cuadro 9.-** Respuesta serológica de los cerdos del Grupo A, que solo recibieron desafío con la "cepa" de campo VC-89-126 ante la prueba de inmunotransferencia empleando como antígenos las cepas virales de campo VC-89-126 y la vacunal PAV-250.

**CERDOS EXPERIMENTALES**

<b>CERDO 11, VC-89-126</b>						
<b>MUESTREO</b>						
1	2	3	4	5	6	7
NEG	NEG	162.02	153.93	NEG	ND	ND
		125.91	146.24			
		79.08-	125.41			
		67.82	113.2			
		64.43-	97.07-			
		58.15	79.08			
		52.49	64.43			
			55.25			
			49.87			
<b>CERDO 11, PAV-250</b>						
<b>MUESTREO</b>						
1	2	3	4	5	6	7
NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	ND	ND

<b>CERDO 12, VC-89-126</b>						
<b>MUESTREO</b>						
1	2	3	4	5	6	7
NEG	NEG	170.54	188.84	146.24	NEG	ND
		153.93	162.02			
			146.24			
			79.08			
<b>CERDO 12, PAV-250</b>						
<b>MUESTREO</b>						
1	2	3	4	5	6	7
NEG	NEG	NEG	79.08	NEG	NEG	ND

<b>CERDO 13, VC-89-126</b>						
<b>MUESTREO</b>						
1	2	3	4	5	6	7
NEG	NEG	NEG	NEG	198.87	ND	ND
				138.94		
				125.11		
				113.20		
				97.07		
				58.15		



				36.67		
				31.45		
<b>CERDO 13, PAV-250</b>						
<b>MUESTREO</b>						
1	2	3	4	5	6	7
63.23	NEG	NEG	NEG	NEG	ND	ND

<b>CERDO 14, VC-89-126</b>						
<b>MUESTREO</b>						
1	2	3	4	5	6	7
NEG	NEG	NEG	97.07	147.04	ND	ND
			79.08	113.20		
				102.17-		
				79.08		
				75.13-		
				67.82		
				58.15		
				55.25		
				38.60		
				29.87		
<b>CERDO 14, PAV-250</b>						
<b>MUESTREO</b>						
1	2	3	4	5	6	7
106.4	NEG	NEG	NEG	NEG	ND	ND

**CERDOS CENTINELAS**

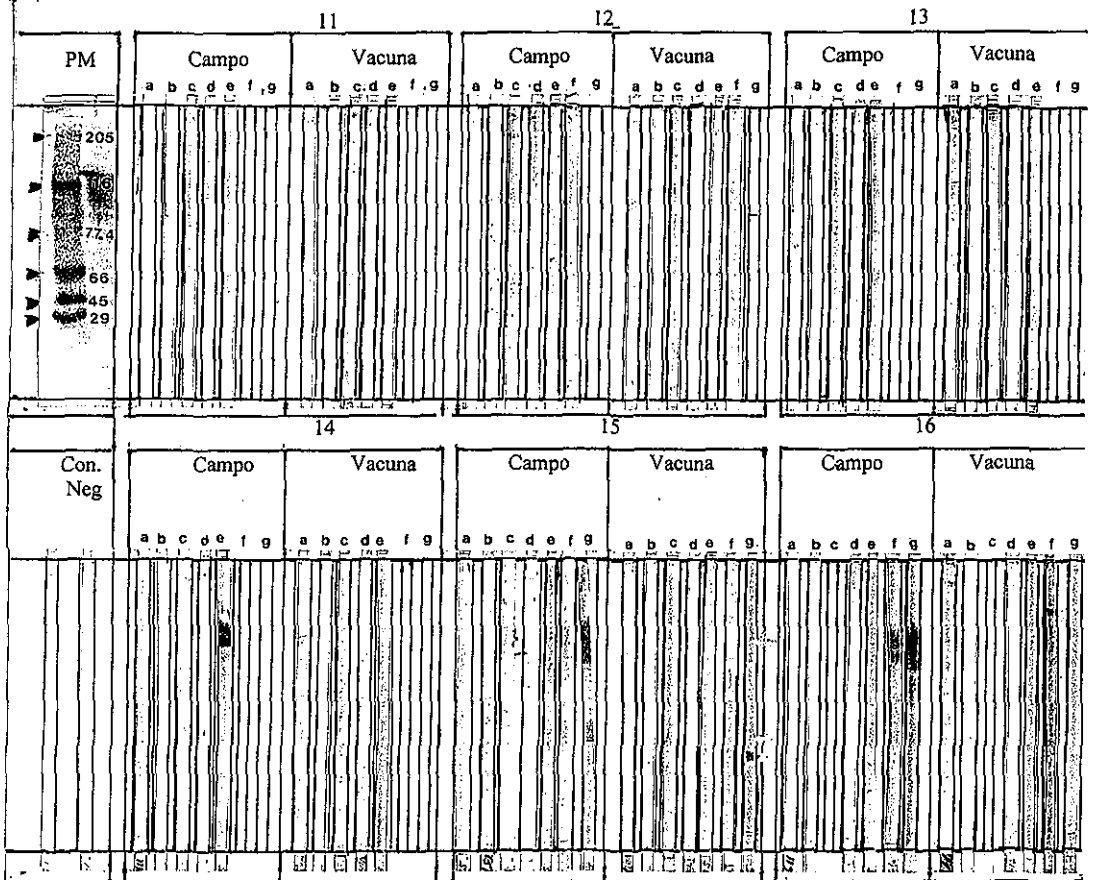
<b>CERDO 15, VC-89-126</b>						
<b>MUESTREO</b>						
1	2	3	4	5	6	7
NEG	NEG	NEG	NEG	146.24	ND	102.17-
				113.2		64.43
				97.07-		59.66
				79.08		53.85
				36.67-		36.67-
				31.65		31.45
<b>CERDO 15, PAV-250</b>						
<b>MUESTREO</b>						
1	2	3	4	5	6	7
NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	ND	28.28-
						25.63
<b>CERDO 16, VC-89-126</b>						
<b>MUESTREO</b>						
1	2	3	4	5	6	7
NEG	NEG	ND	NEG	79.08-	154.81	102.17-

**ESTA TESIS NO SALA  
DE LA BIBLIOTECA**

				67.82	102.54- 87.87 79.27- 71.51	64.43 58.15 36.67- 31.45
<b>CERDO 16, PAV-250</b>						
<b>MUESTREO</b>						
1	2	3	4	5	6	7
66.6	NEG	ND	NEG	NEG	119.67	NEG

(Nos. 11-14 = cerdos experimentales, Nos.15 y 16 = cerdos centinelas, NEG = Negativos, ND = No determinado)

Figura 4.- Inmunotransferencias realizadas con los sueros de los cerdos del Grupo A, que sólo recibieron desafío con la "cepa" de campo VC-89-126.



El Grupo A se formó por cuatro cerdos experimentales (Nos. 11-14) y dos cerdos centinelas (Nos. 15,16). Como antígeno para las pruebas se empleó la "cepa" de campo VC-89-126 y la "cepa" vacunal PAV-250. Los muestreos se realizaron con un intervalo de cinco días. Las letras a-g corresponden a los muestreos; siendo a = primer muestreo (día 1), b = segundo muestreo (día 5), c = tercer muestreo (día 10), d = cuarto muestreo (día 15), e = quinto muestreo (día 20), f = sexto muestreo (día 25), g = séptimo muestreo (día 30) Con. Neg. = Control negativo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Grupo B.-** En este Grupo la respuesta serológica de los cerdos experimentales se presentó entre el quinto y el séptimo muestreo en contra del antígeno de campo VC-89126 siendo más marcada la respuesta del cerdo número 26, el cual montó respuesta en contra de casi todas las proteínas que se registraron en el patrón electroforético.

La respuesta de los cerdos centinelas fue muy reducida ya que en uno de los cerdos (No 27) sólo se detectó respuesta contra siete proteínas y en el otro (No. 28) sólo se registró respuesta en contra de 3 proteínas. Los resultados se resumen en el Cuadro 10 y en la Figura 5

**Cuadro 10.-** Respuesta serológica de los cerdos del Grupo (B), que recibieron 2 vacunaciones y desafío con cepa de campo, detectadas por la prueba de inmunotransferencia, empleando como antígenos las cepas vírales de campo VC-89-126 y la vacunal PAV-250.

**CERDOS EXPERIMENTALES**

CERDO 23, VC-89-126						
MUESTREO						
1	2	3	4	5	6	7
NEG	NEG	31.45	NEG	147.04	162.02	153.93
				139.66	153.93	146.24
				126.00	146.24	138.94
				113.67	138.94	128.66
				64.52	132.00	113.20
				58.20	125.41	107.54
				52.51	119.15	102.17-
				31.38	113.20	75.13
					107.54-	59.66
					92.22	53.85
					83.24	48.61
					64.43	
					58.15	
					55.25	
CERDO 23, PAV-250						
MUESTREO						
1	2	3	4	5	6	7
NEG	NEG	NEG	52.49	NEG	NEG	NEG
CERDO 24, VC-89-126						
MUESTREO						
1	2	3	4	5	6	7
101.7	NEG	75.04	NEG	154.81	162.02	119.15
				147.04	153.93	107.54-
				139.66	132.00	67.82

				132.65	119.15	61.21
				126.65	97.07	55.25
				113.67	83.24	51.16
				107.96	79.08	34.84
				97.60-	71.38	
				79.27		
				64.52		
				58.20		

**CERDO 24, PAV-250**

**MUESTREO**

1	2	3	4	5	6	7
NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

**CERDO 25, VC-89-126**

**MUESTREO**

1	2	3	4	5	6	7
NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	162.02	153.93
					153.93	128.66
					146.24	
					138.94	
					132.00	
					119.15	
					87.62-	
					79.08	
					58.15	

**CERDO 25, PAV-250**

**MUESTREO**

1	2	3	4	5	6	7
NEG	NEG	NEG	24.34	NEG	NEG	179.51
			23.12			132.00
						119.15
						102.47-
						75.18
						64.21-
						55.25
						49.87

**CERDO 26, VC-89-126**

**MUESTREO**

1	2	3	4	5	6	7
NEG	NEG	ND	NEG	171.60	179.51	184.16
				162.99	174.92	179.51
				154.81	170.53	174.97
				147.04	162.02	170.54

				132.65	150.04	157.93
				126.00	146.24	150.04
				113.67	138.94	141.24
				102.54	132.00	132.00
				97.60-	125.41	125.41
				79.27	119.51	113.20
				64.52	113.20	107.54
				58.20	107.54	79.02
				55.28	79.02	61.21
					64.43	58.15
					58.15	52.49
					55.25	47.38
					34.84	45.01
						40.63
<b>CERDO 26, PAV-250</b>						
<b>MUESTREO</b>						
1	2	3	4	5	6	7
NEG	NEG	ND	NEG	NEG	NEG	NEG

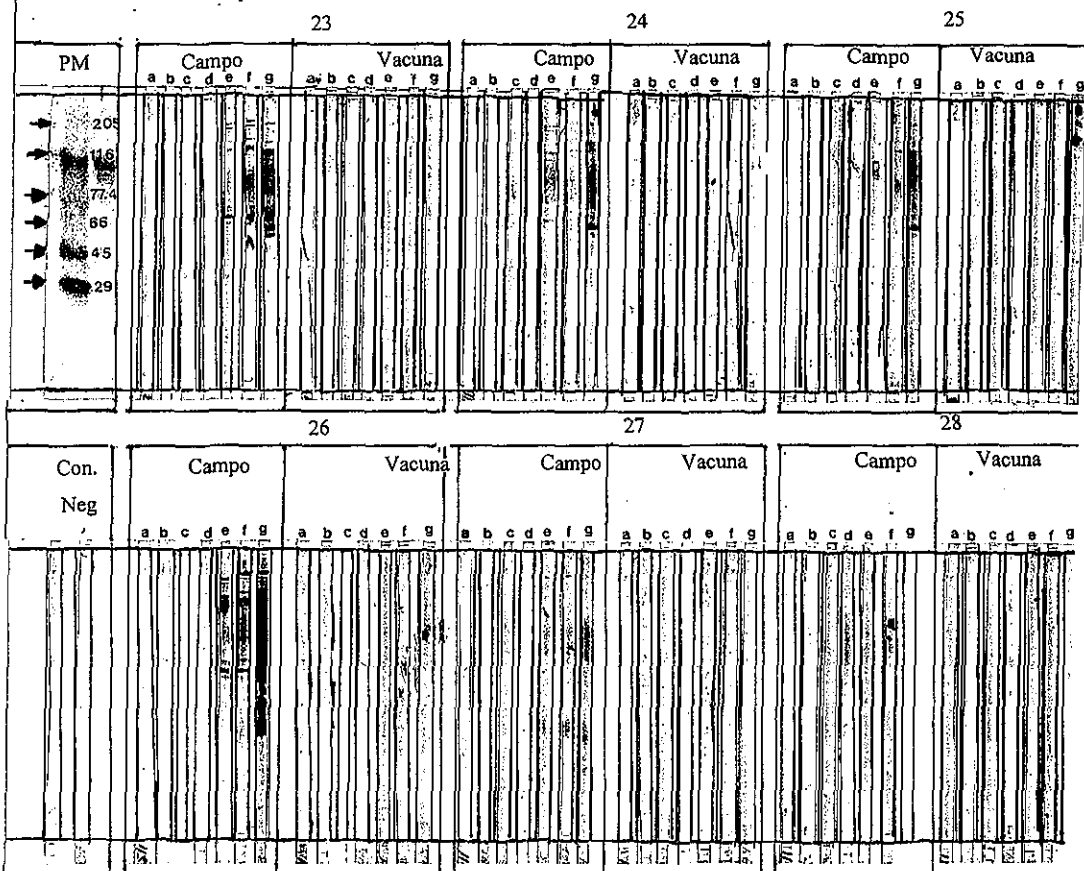
**CERDOS CENTINELAS**

<b>CERDO 27, VC-89-126</b>						
<b>MUESTREO</b>						
1	2	3	4	5	6	7
NEG	NEG	NEG	NEG	154.81	153.93	153.93
				97.60	97.07	102.17
				79.27	87.62	64.43
				36.62	79.02	34.84
				31.38	71.38	28.28
					36.67	
					29.87	
<b>CERDO 27, PAV-250</b>						
<b>MUESTREO</b>						
1	2	3	4	5	6	7
NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	58.15
						42.76
						28.38
<b>CERDO 28, VC-89-126</b>						
<b>MUESTREO</b>						
1	2	3	4	5	6	7
NEG	NEG	NEG	97.07	102.54	102.17	ND
			79.08	87.47	87.62	
				67.53		
<b>CERDO 28, PAV-250</b>						

MUESTREO						
1	2	3	4	5	6	7
NEG	NEG	NEG	64.43	NEG	NEG	ND

(Nos. 23-26= cerdos experimentales Nos. 27 y 28 = cerdos centinelas Neg = Negativo, ND = No determinado)

Figura 5.- Inmunotransferencias realizadas con los sueros de los cerdos del Grupo B, que recibieron 2 dosis de vacuna PAV-250 y desafió con la "cepa" de campo VC-89-126.



El Grupo B se formó por cuatro cerdos experimentales (Nos. 23-26) y dos cerdos centinelas (Nos. 27,28). Como antígeno para las pruebas se empleó la "cepa" de campo VC-89-126 y la "cepa" vacunal PAV-250. Los muestreos se realizaron con un intervalo de cinco días. Las letras a-g corresponden a los muestreos; siendo a = primer muestreo (día 1); b = segundo muestreo (día 5), c = tercer muestreo (día 10), d = cuarto muestreo (día 15), e = quinto muestreo (día 20), f = sexto muestreo (día 25), g = séptimo muestreo (día 30) Con. Neg. = Control negativo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Grupo C.-** Los cerdos experimentales mostraron una respuesta inmune a partir del cuarto muestreo y hasta el final del experimento en contra del antígeno de campo VC89.126 siendo en general la misma respuesta en todos los cerdos, en contra del antígeno vacunal PAV-250 respuesta fue mínima.

En los cerdos centinelas hubo respuesta en contra del antígeno de campo siendo limitada la respuesta ya que sólo se registró respuesta contra algunas proteínas y contra el antígeno vacunal la respuesta fue mínima. Los resultados de las inmunotransferencias y los pesos moleculares se resumen en el Cuadro 11 y en la Figura 6.

**Cuadro 11.-** Respuesta serológica de los cerdos del Grupo C, que recibieron una dosis de vacuna y el desafío con "cepa" de campo ante la prueba de inmunotransferencia, empleando como antígenos las "cepas" vírales de campo VC-89-126 y la vacunal PAV-250.

**CERDOS EXPERIMENTALES**

CERDO 17, VC-89-126						
MUESTREO						
1	2	3	4	5	6	7
NEG	NEG	NEG	NEG	154.81	184.16	119.15
				147.04	162.02	102.17-
				119.15	153.93	64.43
				113.67	146.24	61.21
				97.40-	138.94	55.25
				79.27	132.00	52.49
				64.52	125.41	
				58.20	119.15	
				52.51	113.20	
				34.78-	102.14-	
				31.38	87.62	
					79.02-	
					71.78	
					64.43	
					58.15	
					55.25	
					38.60-	
					31.45	
CERDO 17, PAV-250						
MUESTREO						
1	2	3	4	5	6	7
73.91	NEG	NEG	75.13	NEG	NEG	NEG
66.60						

CERDO 18, VC-89-126						
MUESTREO						
1	2	3	4	5	6	7
NEG	NEG	NEG	NEG	154.81	179.51	179.51
				147.04	170.54	170.54
				125.41	162.02	
				113.67	153.93	150.04
				97.40-	142.55	146.24
				79.27	138.94	138.94
				64.52	132.00	132.00
				58.20	125.41	
				52.51	119.15	119.15
					113.20	113.20
					107.54-	107.54-
					87.62	75.13
					79.08-	
					71.38	62.80
					64.43	56.68
					58.15	52.49
					55.25	31.45
					38.60-	30.30
					31.45	
CERDO 18, PAV-250						
MUESTREO						
1	2	3	4	5	6	7
73.91-	NEG	NEG	67.82	NEG	NEG	NEG
66.60						

CERDO 19, VC-89-126						
MUESTREO						
1	2	3	4	5	6	7
NEG	NEG	97.07	146.24	180.66	184.16	184.16
		87.62	92.22	176.07	179.51	171.52
			67.82	171.60	174.97	174.97
				167.24	170.54	170.54
				162.99	166.23	162.02
				154.81	162.02	153.93
				147.04	153.93	146.24
				139.66	146.24	138.94
				132.65	138.94	132.00
				126.00	132.00	119.15
				119.67	125.41	107.54-
				113.67	119.15	79.02

				97.40-	113.20	64.43
				79.27	107.54-	61.21-
				67.93	79.08	52.49
				64.52	64.43	47.28
				58.20	58.15	45.01
				52.51	52.49	40.63-
					47.38	34.84
					34.84-	
					21.45	

**CERDO 19, PAV-250**

**MUESTREO**

1	2	3	4	5	6	7
NEG	NEG	NEG	61.21	NEG	NEG	NEG

**CERDO 20, VC-89-126**

**MUESTREO**

1	2	3	4	5	6	7
NEG	NEG	NEG	113.20	154.81	162.02	179.51
			87.62	147.04	153.93	153.93
				126.00	146.24	146.24
				113.67	130.94	142.55
				64.52	132.00	135.43
				58.20	125.41	132.00
					119.15	119.15
					113.20	107.54
					107.54-	102.97-
					92.22	71.28
					83.24	61.21-
					69.43	52.49
					58.15	49.87
					55.25	45.01
						34.84

**CERDO 20, PAV-250**

**MUESTREO**

1	2	3	4	5	6	7
NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

**CERDOS CENTINELAS**

**CERDO 21, VC-89-126**

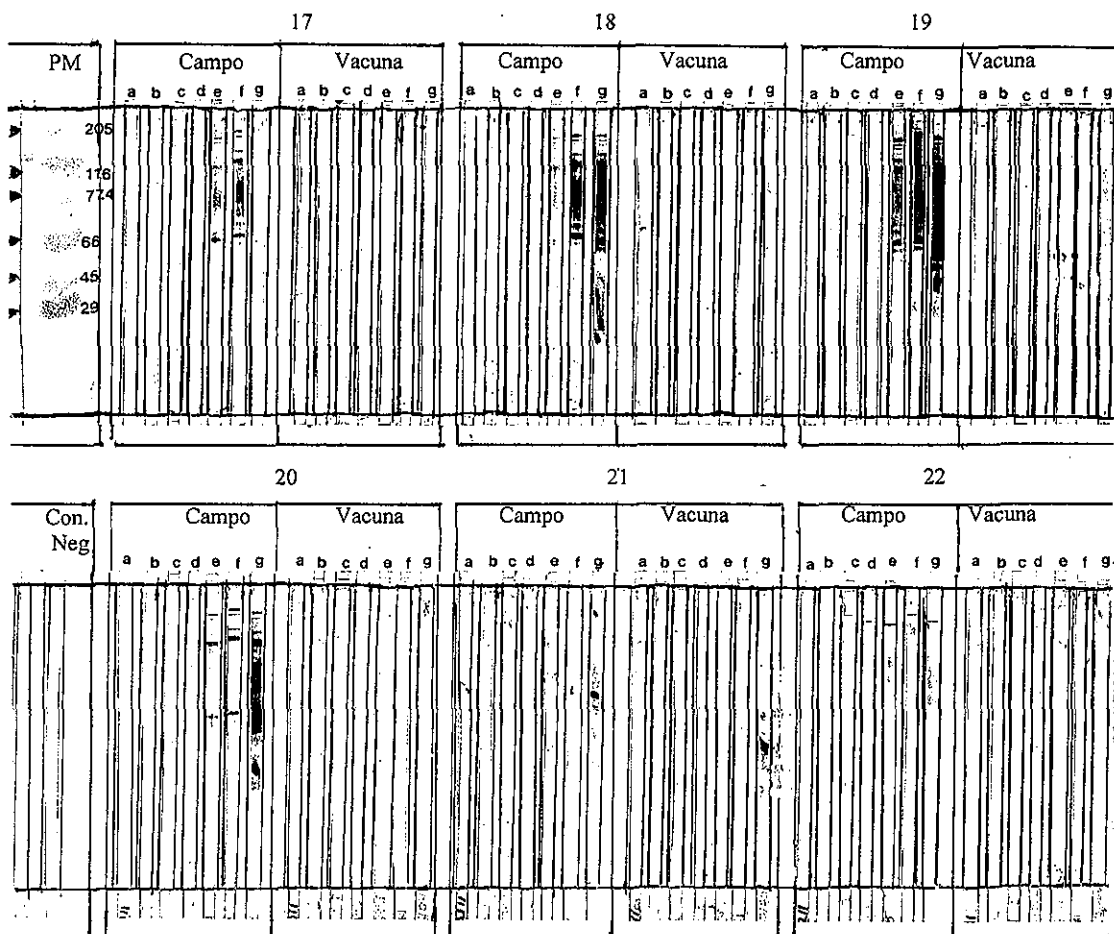
**MUESTREO**

1	2	3	4	5	6	7
NEG	NEG	NEG	146.24	NEG	97.07-	NEG
			138.94		87.62	

			132.00		79.08-	
			119.15-		71.38	
			113.20		36.67-	
			97.07-		61.45	
			79.08			
			61.21			
			36.67-			
			29.87			
<b>CERDO 21, PAV-250</b>						
<b>MUESTREO</b>						
1	2	3	4	5	6	7
106.46	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
<b>CERDO 22, VC-89-126</b>						
<b>MUESTREO</b>						
1	2	3	4	5	6	7
NEG	NEG	NEG	146.24	147.04	153.93	102.17-
			97.07-	107.96-		79.02
			79.08	97.60		71.38-
				79.27		68.43
				75.29-		
				67.93		
<b>CERDO 22, PAV-250</b>						
<b>MUESTREO</b>						
1	2	3	4	5	6	7
NEG	NEG	NEG	153.93	NEG	NEG	NEG
			87.62-			
			75.13			

(Nos. 17-20 = cerdos experimentales, Nos. 21 y 22 = cerdos centinelas NEG = Negativos)

**Figura 6.- Inmunotransferencias realizadas con los sueros de los cerdos del Grupo C, que recibieron una dosis de vacuna PAV-250 y el desafío con la "cepa" de campo VC-89-126.**



El Grupo C se formó por cuatro cerdos experimentales (Nos. 17-20) y dos cerdos centinelas (Nos. 21,22). Como antígeno para las pruebas se empleó la "cepa" de campo VC-89-126 y la "cepa" vacunal PAV-250. Los muestreos se realizaron con un intervalo de cinco días. Las letras a-g corresponden a los muestreos; siendo a = primer muestreo (día 1), b = segundo muestreo (día 5), c = tercer muestreo (día 10), d = cuarto muestreo (día 15), e = quinto muestreo (día 20), f = sexto muestreo (día 25), g = séptimo muestreo (día 30) Con. Neg. = Control negativo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Grupo D.-** En este Grupo formado por cuatro cerdos experimentales, que no recibieron ningún tratamiento, se registró respuesta contra el antígeno de campo principalmente al sexto y séptimo sangrado.

Contra el antígeno vacunal casi no se registró respuesta. Los resultados se muestran en el Cuadro 12 y en la Figura 7.

**Cuadro 12.-** Respuesta de los sueros de los cerdos del Grupo D que no recibieron ningún tratamiento a la prueba de inmunotransferencia, empleando como antígenos la "cepa" viral de campo VC-89-126 y la vacunal PAV-250.

**CERDOS EXPERIMENTALES**

<b>CERDO 1, VC-89-126</b>						
<b>MUESTREO</b>						
1	2	3	4	5	6	7
ND	NEG	83.2	NEG	153.93	162.99	162.02
				146.24	154.81	153.93
				55.25	136.11	146.24
					132.65	138.94
					126.00	125.41
					102.5-	119.51
					83.63	102.17-
					75.2-	67.82
					71.51	62.8
					58.2	56.68
						52.49
						47.38
						38.60
<b>CERDO 1, PAV-250</b>						
<b>MUESTREO</b>						
1	2	3	4	5	6	7
NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

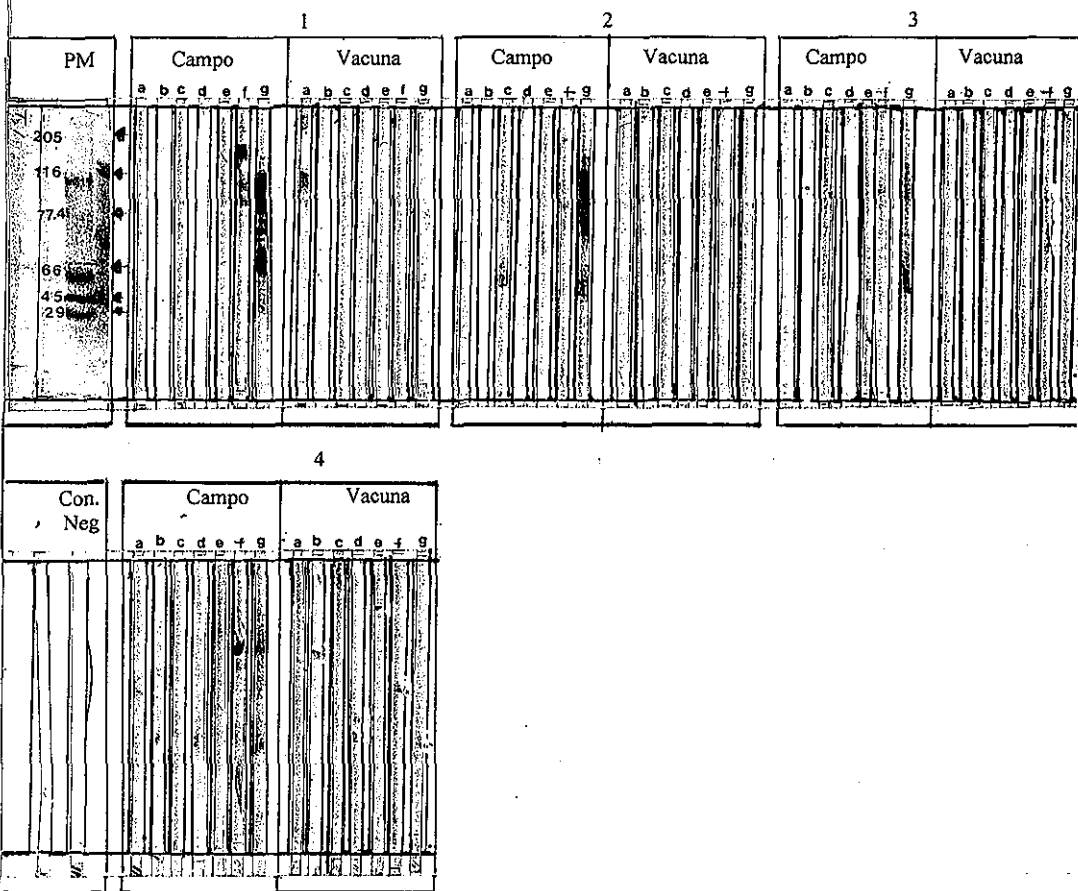
<b>CERDO 2, VC-89-126</b>						
<b>MUESTREO</b>						
1	2	3	4	5	6	7
NEG	NEG	NEG	ND	52.49-	162.99	153.93
				47.38	154.81	146.29
					132.65	132.00
					126.0	119.15
					102.54-	102.17-
					83.67	75.13
					79.27-	64.43-
					71.91	55.25

					58.2	51.16
					34.78-	33.10
					31.38	29.87
<b>CERDO 2, PAV-250</b>						
<b>MUESTREO</b>						
1	2	3	4	5	6	7
NEG	NEG	NEG	ND	NEG	NEG	NEG

<b>CERDO 3, VC-89-126</b>						
<b>MUESTREO</b>						
1	2	3	4	5	6	7
NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	92.51-	97.07-
					83.46	79.02
					52.51	31.45
					44.99	29.87
<b>CERDO 3, PAV-250</b>						
<b>MUESTREO</b>						
1	2	3	4	5	6	7
NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
<b>CERDO 4, VC-89-126</b>						
<b>MUESTREO</b>						
1	2	3	4	5	6	7
NEG	NEG	NEG	55.25	NEG	119.67	153.93
			33.1		87.87-	146.24
			29.87		79.27	32.00
					31.38	119.15
						102.17-
						75.10
						64.43-
						55.25
						51.16
						33.10
						29.87
<b>CERDO 4, PAV-250</b>						
<b>MUESTREO</b>						
1	2	3	4	5	6	7
NEG	NEG	NEG	40.63	125.41	NEG	NEG
			33.10			

(Nos. 1-4 = cerdos experimentales, NEG = Negativo, ND= No determinado)

Figura 7.- Inmunotransferencias realizadas con los sueros de los cerdos del Grupo D, que no recibieron ningún tratamiento.



El Grupo D se formó solamente por cuatro cerdos experimentales (Nos: 1-4). Como antígeno para las pruebas se empleó la "cepa" de campo VC-89-126 y la "cepa" vacunal PAV-250. Los muestreos se realizaron con un intervalo de cinco días. Las letras a-g; corresponden a los muestreos; siendo a = primer muestreo (día 1), b = segundo muestreo (día 5), c = tercer muestreo (día 10), d = cuarto muestreo (día 15), e = quinto muestreo (día 20), f = sexto muestreo (día 25), g = séptimo muestreo (día 30) Con. Neg. = Control negativo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Grupo E.-** La respuesta de los cerdos experimentales se registró a partir del tercer sangrado, principalmente en contra del antígeno de campo VC-89-126; siendo más marcada al sexto y séptimo sangrado; y fue siendo casi nula contra el antígeno vacunal PAV-250.

Los cerdos centinelas también respondieron en contra del antígeno de campo mientras que contra el antígeno vacunal la respuesta fue negativa. Los resultados se muestran en el Cuadro 13 y la Figura 8.

**Cuadro 13.-** Respuesta serológica de los cerdos del Grupo E que sólo recibieron dos dosis de la vacuna PAV-250 ante la prueba de inmunotransferencia, empleando como antígenos las "cepas" vírales de campo VC-89-126 y la vacunal PAV-250.

**CERDOS EXPERIMENTALES**

CERDO 5, VC-89-126						
MUESTREO						
1	2	3	4	5	6	7
NEG	NEG	162.02	97.07-	97.07-	97.49-	102.17-
		125.4	83.24	83.24	87.8	67.82
		61.21	75.13-	79.8-	79.27-	
		34.84	67.82	67.42	71.51	
			29.82		47.37-	
					40.59	
CERDO 5, PAV-250						
MUESTREO						
1	2	3	4	5	6	7
NEG	NEG	NEG	153.93	NEG	NEG	NEG
			47.38-			
			38.60			
CERDO 6, VC-89-126						
MUESTREO						
1	2	3	4	5	6	7
NEG	NEG	ND	ND	79.02-	162.98	153.93
				67.82	147.04	146.24
				34.84-	119.67	138.94
				29.87	97.67-	132.00
					87.8	102.17-
					34.78-	69.43
					31.38	61.21
						58.15

						55.25
<b>CERDO 6, PAV-250</b>						
<b>MUESTREO</b>						
1	2	3	4	5	6	7
NEG	NEG	ND	ND	NEG	NEG	NEG

<b>CERDO 7, VC-89-126</b>						
<b>MUESTREO</b>						
1	2	3	4	5	6	7
NEG	NEG	102.17- 83.24 79.08- 71.38 38.6- 33.10	113.2 97.07- 79.08 75.13- 64.43 58.15 52.18 34.84- 29.87	119.15 102.17- 87.62 65.13- 67.82	162.99 154.81 139.66 119.67 97.41- 83.46 79.27 71.51 58.2	153.93 119.15 97.07- 64.43 61.21 55.25 49.87 47.38
<b>CERDO 7, PAV-250</b>						
<b>MUESTREO</b>						
1	2	3	4	5	6	7
NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

<b>CERDO 8, VC-89-126</b>						
<b>MUESTREO</b>						
1	2	3	4	5	6	7
NEG	NEG	102.17- 83.24 79.08- 71.38 38.6-33.1	97.07- 79.08 75.13- 64.43 58.15 52.49 34.89- 29.87 16.15	153.93 64.43	162.99 132.65 126.01 119.67 97.41- 83.46 23.04	153.93 119.15 97.07- 64.43 61.21 55.25 49.87 47.37
<b>CERDO 8, PAV-250</b>						
<b>MUESTREO</b>						
1	2	3	4	5	6	7
NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	97.62

**CERDOS CENTINELAS**

**CERDO 9, VC-89-126**

MUESTREO						
1	2	3	4	5	6	7
NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	119.67	153.93
					79.27-	125.11
					71.51	119.15
						107.54
						102.17-
						64.47
						61.21
						53.85
						49.87
						34.84
						31.45

**CERDO 9, PAV-250**

MUESTREO						
1	2	3	4	5	6	7
NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

**CERDO 10 VC-89-126**

MUESTREO						
1	2	3	4	5	6	7
NEG	NEG	NEG	146.24	113.20-	97.40-	102.17-
			125.41-	87.07	83.46	64.43
			113.20		36.62-	52.49
			97.07-		24.80	34.84
			79.08			30.60
			38.60-			
			34.84			
			33.16-			
			29.87			

**CERDO 10 PAV-250**

MUESTREO						
1	2	3	4	5	6	7
NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

(5-8 = cerdos experimentales, 9 y 10 = cerdos centinelas NEG = Negativo)

**Figura 8.- Inmunotransferencias realizadas con los sueros de los cerdos del Grupo E, que sólo recibieron dos dosis de vacuna PAV-250 sin desafío con la "cepa" de campo VC-89-126.**

PM	5									6									7																					
	Campo			Vacuna			Campo			Vacuna			Campo			Vacuna																								
	a	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d	e	f	g					
209																																								
116																																								
774																																								
66																																								
45																																								
29																																								
Con. Neg	Campo			Vacuna			Campo			Vacuna			Campo			Vacuna																								
	a	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d	e	f	g					

El Grupo E se formó por cuatro cerdos experimentales (Nos. 5-8) y dos cerdos centinelas (Nos. 9,10). Como antígeno para las pruebas se empleó la "cepa" de campo VC-89-126 y la "cepa" vacunal PAV-250. Los muestreos se realizaron con un intervalo de cinco días. Las letras a-g corresponden a los muestreos; siendo a = primer muestreo (día 1), b = segundo muestreo (día 5), c = tercer muestreo (día 10), d = cuarto muestreo (día 15), e = quinto muestreo (día 20), f = sexto muestreo (día 25), g = séptimo muestreo (día 30) Con. Neg. = Control negativo.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

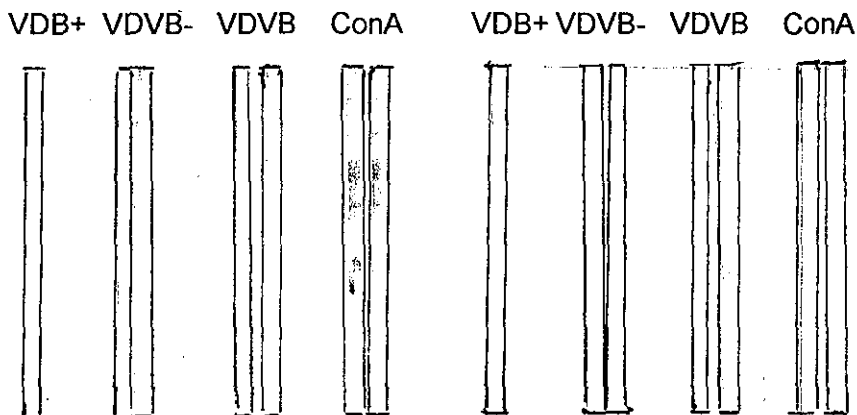
### 5.11. Detección de las glicoproteínas.

Con la prueba realizada para detectar las glicoproteínas, tanto de la "cepa" de campo como de la "cepa" vacunal sólo se detectó una reacción positiva ante la cepa de campo VC-89-126. En las tiras que contenían el antígeno vacuna de la cepa PAV-250 no se detectó ninguna banda esta prueba se repitió varias ocasiones para tratar de determinar cual fue la causa de la ausencia de respuesta del antígeno vacunal siendo en todas las ocasiones negativas (Figura 9).

### 5.12. Detección de los antígenos contra DVB Y BDV.

Al enfrentar el antígeno de campo y el de la vacuna con sueros positivos contra el Virus de Diarrea Viral Bovina (VDVB) y el Virus Enfermedad de la Frontera (VDB), no se detectó ninguna reacción en contra de estos antígenos (Figura 9).

**Figura 9.-** Inmunotransferencias de los sueros: positivo al virus de Diarrea Viral Bovina (VDVB+) negativo al virus de Diarrea Viral Bovina (VDVB-), positivo al virus de la Enfermedad de la Frontera (VDB+) y Concanavalina A peroxidada (Con A) enfrentados al antígeno de campo VC-89-126 (A) y la cepa vacunal PAV-250 (B)



A (VC-89-125)

B (PAV-250)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 6.0 Discusión

La diferencia entre las cepas de alta virulencia del virus de la Fiebre Porcina Clásica y las cepas de baja virulencia o atenuadas es el periodo de incubación. Ambos tipos de virus se multiplican en el animal, pero las cepas virulentas lo hacen tan rápidamente que no dan tiempo al animal de montar una respuesta inmunitaria importante. Las cepas de baja virulencia, en cambio, se multiplican más lentamente en el animal dándole a éste la oportunidad de montar una respuesta humoral y una celular de magnitud suficiente para detener el avance viral y permitir que el animal sobreviva. El periodo de incubación de una infección aguda es inversamente proporcional a la dosis, es decir, mientras más baja sea la dosis de desafío, más largo será el periodo de incubación (21, 96). La producción de altos niveles de anticuerpos contra una cepa virulenta de campo como la VC-89-126 para la conducción de las pruebas aquí comunicadas represento un reto que consideramos haber enfrentado con éxito al titular esta cepa en cerdos y haber utilizado dosis repetidas y subletales de la cepa virulenta de campo.

Tanto los dos primeros cerdos susceptibles en los que se produjo la infección con dosis muy bajas de la cepa VC-89-126 y que permitió la supervivencia de los animales por 30 y 38 días como los pertenecientes al grupo experimental, de los cuales murió uno antes de los 30 días que marcaron el final del experimento, se logró imitar una infección crónica en la que los cerdos desarrollaran una infección lenta y progresiva que permitió el desarrollo de altos niveles de anticuerpos necesarios para las pruebas serológicas planteadas (15, 16, 77, 84, 96, 97, 98).

El éxito de obtener anticuerpos contra las tres glicoproteínas virales ( $E^{rbp}$ , E1 y E2) implica que la respuesta serológica fue cualitativa y cualitativamente adecuada para nuestro estudio; lo cual concuerda con lo reportado por Van Oirschot (1988) y Dahle y Liess (1992).

Algunas de las dosis utilizadas para matar a cerdos destetados con la cepa Alfort fueron del orden de 10 dosis infectantes de cultivo celular ( $DICC_{50\%}$ ) por cerdo, de los cuatro animales inoculados tres murieron en tanto que los otros tres desarrollaron un alto nivel de anticuerpos neutralizantes (21). Nuestros hallazgos

fueron semejantes utilizando la cepa VC-89-126. Esta cepa considerada de alta patogenicidad, causo la muerte de uno de los cerdos antes de la conclusión del experimento a los 30 días. Carbrey (1977), por otra parte, menciona que el cerdo es hasta diez veces más susceptible que el cultivo celular para detectar al virus de la FPC (7).

El grupo A de cuatro cerdos que recibieron la dosis supuestamente subletal del virus VC-89-126 patógeno causó, como ya se había mencionado arriba, la muerte de tres de los cerdos inoculados días antes de la conclusión del experimento, les permitió desarrollar una buena respuesta de anticuerpos que resultaron útiles para las pruebas serológicas planteadas.

Desde el punto de vista clínico, los cerdos del grupo inoculado experimentalmente solo con el virus patógeno y sin vacunación (Grupo A) desarrolló toda la sintomatología clásica de la FPC, cuyos síntomas más marcados fueron la anorexia, las convulsiones, la incoordinación muscular, la parálisis del tren posterior, el temblor muscular y el apilamiento (síntoma de fiebre). Las lesiones principales a la necropsia se caracterizaron por piel cianótica, infartos del bazo, hemorragias o petequias en riñones o vejiga y la válvula ileocecal y los intestinos con ulceraciones. Sierra y cols (1994) han comunicado resultados similares en experimentos con desafíos subletales en los cuales se induce un cuadro crónico como el nuestro. También concuerda con lo comunicado por Dahle y Liess (1992) en el sentido de que la susceptibilidad individual es variable.

En los cerdos experimentales del grupo B que recibieron dos dosis de vacuna PAV-250 y el desafío con la cepa de campo VC-89-126, no se presentaron signos clínicos ni lesiones a la necropsia, lo que concuerda con la noción de que la vacuna protegió a los animales de la enfermedad clínica.

Los cerdos experimentales del grupo C, que recibieron una dosis de vacuna PAV-250 y quince días después una dosis de desafío con la cepa VC-89-126, permanecieron clínicamente sanos y libres de lesiones características de FPC a la necropsia.

En los cerdos del grupo D, que no recibieron ningún tratamiento, y por lo tanto fungieron como testigos de la calidad del aislamiento, no mostraron signos clínicos ni lesiones de FPC.

Los cerdos del grupo E que recibieron dos dosis de vacuna y no fueron expuestos al virus patógeno no mostraron signos de la enfermedad ni lesiones de la misma, con lo cual se confirma la inocuidad de la cepa vacunal.

De todos los centinelas, los del grupo A, cuyo grupo experimental solo recibió el desafío con virus patógeno, fueron los que mostraron los signos y lesiones más marcadas de todos los grupos.

Los cerdos de los grupos B y C que recibieron una y dos dosis de vacuna antes del desafío, tuvieron grupos de centinelas que a su vez desarrollaron signos y lesiones de la FPC. Estos resultados en primer lugar confirman los resultados comunicados por Correa y cols. (1995) en el sentido de que la cepa PAV-250 no se difunde a los centinelas no vacunados; y en segundo lugar, presentan evidencia de que el virus patógeno se multiplica y elimina a partir de animales vacunados, sin embargo, estos resultados son controversiales debido a que González y cols (2001) encuentran en un experimento controlado en el cual los cerdos fueron vacunados con la cepa PAV-250 no difundieron la cepa patógena de desafío ALD. Estos resultados nos sugieren que se deben realizar más pruebas para determinar si los cerdos vacunados no difunden o permiten la multiplicación de los virus de campo ya que con la cepa de referencia empleada no se presentó la difusión de esta a los cerdos expuestos, sin embargo, con la cepa patógena de campo empleada en este trabajo los cerdos presentaron la enfermedad.

Las lesiones pulmonares observadas en todos los grupos, aún en ausencia de aislamiento del agente causal, sugirieron por evidencia serológicas que por lo menos se trató de cerdos portadores de *Pasteurella multocida*. La serología realizada para medir anticuerpos contra los serotipos 1 y 5 de *A. pleuropneumoniae* y que dio resultados positivos en la mayoría de los animales. Los serotipos 1 y 5 son los que se encuentran con mayor frecuencia en los cerdos de México, por lo que consideramos que al igual que la *P. multocida* los cerdos eran portadores de *A. pleuropneumoniae*.



El estudio del patrón electroforético de las cepas virales en estudio, una vez comparado el patrón del lisado celular y del suero fetal bovino que contenía la muestra de la cepa VC-89126 que fue cultivada en células PK15. La cepa PAV-250 utilizada procedía de un lote de vacuna comercial y por lo tanto no contenía detritus celulares reveló diferentes bandas en los dos virus: 258, 194, 151, 108, 46 y 28 Kd para la cepa VC-89-126 y para la cepa vacunal PAV-250 mostró bandas de 145, 113, 100, 75, 65 y 51 Kd. Comparando estos resultados, y teniendo en cuenta las diferentes muestras que se corrieron electroforéticamente, podemos argumentar que si existen diferencias entre cepas de virus de FPC. Sin embargo, estas diferencias no son de tipo antigénico sino de movilidad electroforética. Como se ha mencionado antes (Van Regenmortell, 2000) los virus de este género tienen un genoma constituido por un solo marco de lectura abierta (ORF) flanqueado en los extremos 5' y 3' por un fragmento corto no codificante de alrededor de 250 bases. El ORF es traducido como una poliproteína de la cual derivan tanto las proteínas estructurales como la no estructurales por cortes específicos de las proteasas virales y posiblemente celulares.

El corrimiento electroforético se hizo en geles desnaturalizantes y conteniendo 2-mercaptoetanol, de tal manera que los homodimeros y heterodimeros de las glicoproteínas de la envoltura se desagregaron por ruptura de los enlaces disulfuro que las une y esto no explica las bandas de alto peso molecular encontradas en los geles. La cepa PAV-250 procedente de una vacuna comercial estabilizada y liofilizada contiene únicamente virus liberados al medio de cultivo por la células infectadas y aun cuando su efectividad como vacuna no está en duda, la concentración de proteínas virales es muy baja en comparación con el lisado de células infectadas que se usó para el corrimiento electroforético de la cepa patógena VC-89-126. Es bien sabido que las células infectadas con el virus de la FPC carecen de glicoproteínas virales en su superficie y que la mayor parte del virus permanece asociado a las células en cultivo (Van Regenmortel 2000). El sistema PAV-250/PK-15 es uno de estos sistemas, de tal manera que para la producción del virus vacunal, a las células se les reemplaza el medio de cultivo dos veces por semana y el sobrenadante de los cultivos es el material usado para la

elaboración de las vacunas. Cuando se usó la técnica de anticuerpos fluorescentes para titular ambos virus, lo que se midió fue el virus viable y capaz de iniciar la infección de los monoestratos de prueba. Las proteínas no estructurales, los fragmentos de la poliproteína viral y las proteínas estructurales no ensambladas. Todo esto es para decir que en realidad el parecido de las muestras para el corrimiento electroforético es más aparente que real. Para poder establecer las diferencias electroforéticas reales entre ambas cepas es necesario realizar un procedimiento más adecuado en la purificación de los antígenos empleados como es la ultracentrifugación.

La respuesta inmunitaria de los cerdos del grupo A que solo recibieron una dosis subletal de la cepa virulenta se manifiesta primero contra las proteínas de alto peso molecular y posteriormente contra las de bajo peso molecular. Dado que la poliproteína contiene tanto las proteínas estructurales como no estructurales, esto no es sorprendente ya que el virus patógeno contiene una alta concentración de estas proteínas.

En los grupos B y C que recibieron una y dos dosis de vacuna y luego el desafío, el número de proteínas reconocidas por estos animales es mayor, pero solo se presenta después de la aplicación de la cepa de desafío y no contra la cepa vacunal. Estos resultados se pueden interpretar de dos maneras: primero, la vacunación preparó a los animales para responder a la cepa de campo y lo que observamos es una respuesta anamnésica o segundo: la respuesta provocada por la vacuna resultó por debajo del nivel de detección de nuestra prueba y el desafío con la cepa de campo permitió la multiplicación del virus patógeno en los cerdos vacunados. La enfermedad que presentaron los cerdos centinelas de estos dos grupos parecen favorecer la segunda hipótesis.

En los animales del grupo D, que no recibieron ningún tratamiento y que permanecieron aparentemente sanos durante la prueba mostraron una respuesta de anticuerpos contra la cepa de campo. Los cerdos de este grupo estuvieron alojados en la misma área que los cerdos del grupo E, que solo recibieron dos dosis de la vacuna. Es posible que en ambos grupos la seronegatividad en los primeros muestreos sea solo aparente por ser inferior al umbral mismo de

detección de nuestra prueba. La falta de respuesta contra el virus vacunal podría deberse a falta de antígeno viral en la prueba y cuando aparecen los anticuerpos más tarde en la prueba, sean detectados por los antígenos del virus de campo que se encuentra en mayor concentración.

Cuando se trató de identificar las glicoproteínas virales esto no se consiguió se pensó que la vacuna podría estar contaminada con Virus de Diarrea Viral Bovina o con el Virus de la Enfermedad de la Frontera por lo que se enfrentó los antígenos con sueros monotípicos contra estas enfermedades. Los resultados fueron negativos en ambos casos. Esto confirma la hipótesis de la baja concentración antigénica.

En el futuro si se desea repetir la prueba, será necesario purificar los antígenos virales tanto intra como extracelular y mejorar la sensibilidad de la prueba, dado que pretendíamos era distinguir entre cepas de campo y vacunales, este objetivo parece haberse logrado, pero por razones equivocadas, no detectamos diferencias antigénicas sino diferencias en la concentración de antígenos virales.

## 7.0 Conclusiones

1. Se logró la titulación de las "cepas" de campo y vacunal por la técnica de inmunoperoxidasa.
2. No se logró la purificación de las "cepas" vírales.
3. Se logró establecer la dosis infectante con el virus de campo, que permitió el que se presentara la enfermedad en su forma crónica y por lo tanto desarrolló una respuesta adecuada de anticuerpos, aún cuando la "cepa" está clasificada como de alta virulencia.
4. Se pudieron establecer los patrones electroforéticos de ambas cepas vírales: virus de campo VC-89-126 y virus vacunal PAV-250.
5. La respuesta serológica no se pudo establecer, ya que se obtuvieron pocos resultados con la cepa vacunal.
6. Se logró establecer que la respuesta de anticuerpos en contra de las proteínas vírales, generalmente hubo una respuesta en contra de las proteínas de alto peso molecular y posteriormente se desarrolló la respuesta contra las proteínas de bajo peso molecular.

## 8.0. Bibliografía.

1. Aynaud J.M., (1968). "Étude de la multiplication in vitro d'un clone du virus de la peste porcine". *Rech. Vét.*, 1:25-36.
2. Aynaud, J.M., LeJolly, J.C., Bibard, C, and Galicher, C., (1971). "Étude des propriétés de mutants froids du virus de la peste porcine classique, Application á la vaccination". *Bull. Off. Int. Epizoot.*, 75:654-659.
3. Baker, J.A., L. Coggins, D. Robson, B.E. Sheffy and J. Volenec (1969) Of the 115 (12):1866-1873,.
4. Biront, P., Leunen J., Depierreux, R., Vandevide A., Pastoret, P.P., Dewaele A. (1993). "La peste porcine classique transmission et prophylaxie". *Ann. Med. Vet.* (127): 547-563.
5. Bloemraad, M. (1989) "Detection and differentiation of pestiviruses isolated from pigs in the framework of hog cholera diagnosis". *Laboratory Manual of Diagnosis procedures for Hog Cholera as Profaned at the central Veterinaiy Institute, Lelystad, Netherlands.* pp. 1-22.
6. Bradford, M.N., (1976). "A rapid and sensitive method for the quantification of microquantities of protein". *Anal. Biochem.* 72, pp.248.
7. Bruner, W.D., Gillespie, H.J., (1973). "Hog Cholera. Hagan's infectious diseases of domestic animals". Sixth Edition. Comstock Publishing Associates. Cornell University Press. pp 1266-1283.
8. Buonavoglia C., Falcone E., Pestalozza S., Di Trania L. and D'Amore E. (1989) "A rapid serum neutralization test in microplates for the detection of antibodies to hog cholera virus." *J. Virol. Methods* 23: 77-79.
9. Cabrera T.A, (1991). "Logros y avances de la campaña contra la Fiebre Porcina Clásica" *Sintesis Porcina XII.*
10. Caij, A.; Muylderrans, G. De Smet A, Hamers, R. and Koenen, F. (1993). "Production and characterization of monoclonal antibodies against hog chocara virus (Alfort 187 strain)". *Arch Virol.* 131: 185-192.
11. Carbrey, E.A., Stewart, W.C., Kresse, J.I. and Snyder, M.L., (1977). "Inapparent hog cholera infection following the inoculation of field isolates." En: *CEC scmvar on Hog Cholera/Classical Swine Fever and African Swine Fever, Hannover, EUR 5904.* pp 214~230.
12. Casas, J.L., E. Mudespacher M., Marteli, (1976). *Congress, Ames, Iowa, USA.*

13. Coggins, L. B. Sheffy E., and Baker. J.(1964) "Response swine to Hog Cholera Vaccines". Proc. U.S. Livestock San A. 66:316-323.
14. Coggins, L. B.E, (1964). "Study of Hog Cholera colostral antibody and its effect on active Hog Cholera immunization". Am. J. Vet. Res. 25:613-616.
15. Collett, M.S., Larson, R. Gold,C., Strick, D., Anderson, D.K. and Purchio, A. (1988) "Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus Bovine Viral Diarrhea". Virology 165: 191-199.
16. Collett, M.S., Moenning, V. and Horzinek, M.C. (1989). "Recent advances in pestivirus research". Journal of General Virology 70: 253-266.
17. Comité en Fiebre Porcina Clásica. (1994) "Fiebre Porcina Clásica" Investigaciones Actuales: Necesidades y Perspectivas para el diagnóstico. Memorias de la tercera reunión anual del Consejo Técnico Consultivo Nacional de Sanidad Animal, pp 222.
18. Correa G. P. (1981). "Cólera porcino". Enfermedades virales de los animales domésticos (monogástricos). Vol 1. 4a Edición. Editor por Correa-Girón. Coordinación y Producción. Arte e Impresos B.J., pp 7-28.
19. Correa G. P., Baker J.A., Sheffy B.E., Ochoa M. C. y Mancisidor A. N. (1 975). "Una vacuna mejorada para controlar el Cólera Porcino" Porcira. 29; 34-40.
20. Correa G., P. y Ugarte C. R. (1972). "Potencia de sueros y vacunas comerciales contra el cólera Porcino". Téc. Pec. Méx., 21: 47.
21. Correa, G.P, Mancisidor N., Ochoa, M. C., Aguirre, J., y Larios F. (1974) "Inocuidad y potencia de vacuna contra la Cólera Porcino". Resúmenes de la XI.reunión Anual del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, 11 al 16 de Febrero. México, D.F., p.p. 10-11.
22. Correa, G.P., Coba, A, Baez M., R.U., Anaya, E.A. (1994). "Protección conferida por la vacuna PAV-250, contra la Fiebre Porcina Clásica al vacunar cerdos de 1, 7, 15 y 21 días de edad". Porcira. (4): 6-15.
23. Corthier, G., (1978). "Cellular and humoral immune-response in pigs given vaccinal and chronic hog cholera viruses". Am, J, Vet, Res. 39: 1841-1844.
24. Corthier, G., Aynaud, J.M., Galicher, C and Gelfi, J., (1974). "Activité antigénique comparée de deux togavirus: le virus de la peste porcine et le virus de la maladie des muqueuses." Ann. Reach. Vét., 5: 373-393.
25. Corthier, G., Labadie, S.P. and Petit, E., (1977). "Response immunitaire homorale et cellulaire du porc consécutive á la vaccination ou á Infection

- subclinique par le virus de la peste porcine classique". *Bull, Acad, Vét. Fr.*, 50: 425-433.
26. Cotral, E. G. (1978). "Togavirus Manual of standardized methods for Veterinary Microbiology". Comstock Publishing Associates. Cornell University Press pp 311-314.
  27. Charley, B., Corthier, G., Houdayer, M. and Rouzé, P. (1980). "Modifications des reations immunitaires au cours de la peste porcine classique". *Ann. Reach. Vét.*, 11:27-33.
  28. Chen, C.S., Huang, T.S., Lin T.C. and Sheffy B.E., (1976). "Proceedings PVS. Congress" Ames, Iowa, USA. Proceedings IPVS p. 11.
  29. Cheville, N.F., and Mengeling, W.L., (1969). "The pathogenesis of chronic hog cholera (swinc fever). I. Histologic, immunofluorescent, and electron microscopic studies". *Lab. Invest.*, 20: 26 1 274.
  30. Cheville, N.F. and Mengeling W.L and Zinober, M.R., (1970). "Ultraescultural and immununofluorescencet studies of glomerulonephritis in chronic hog cholera". *Lab. Invest.*, 22: 458467.
  31. Donis, O.R., Corapi, W. and Dubovi E.J. (1988). "Neutralizing monoclonal antibodies to Bovine Diarrhoea Virus bind to the 56K to 58K glycoprotein". *J. Gen. Virol.* 69: 77-86.
  32. Donis, O.R. and Dubovi, E.J. (1987). "Glycoproteins of Bovine Diarrhoea VirusMueosal disease virus in infected bovine cells". *Journal of General Virology* 68: 1607-1616.
  33. Dorset M., McBryde, C.N., Nile, W.B., Rietz, J.H., (1991). "Observations concerning the dissemination of hog cholera by insects". *J. Am. Vet. Med. Assoc.* (14):55-60.
  34. Dubois, M., Giles, K.A, Hamilton, J.K, Rbers, P.A. (1956). "Cuantificación de carbohidratos con reactivo de fenol- ácido sulfúrico". *Anal. Chem.* 28: 350.
  35. Dunne, H.W. and Clark, C.D., (1968). "Ernbyronic death, foetal mummification, stillbirth and neonatal death in pigs of gilts vaccinated with attenuated live virus hog cholera vaccine". *Am. J. Vet. Res.* 29: 787-796.
  36. Dunne, H.W., (1964). "Hog cholera" En: *Diseases of Swine*, H.W. Dunne(Ed), 2nd ed. Iowa State University Press. Ames, IA, pp. 140-186.
  37. Dunne, H.W., (1973). "Hog cholera (European Swine fever)". *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, 17: 315-359.

38. Dunne, H.W., (1975). "Hog cholera" En: Diseases of Swine, H.W. Dunne and A.D. Leman (Eds.), 4th ed. Iowa State University Press, Ames, I.A. pp 189-255.
39. Edwards S., and Sands J.J. (1990) "Antigenic comparisons of hog cholera virus isolates from Europe, America and Asia Using monoclonal antibodies." *Dtsch. tierärztl. Wschr* 97(2): 57-104.
40. Edwards S., Moennig V., and Wesvoort G. (1991) "The development of an international reference panel of monoclonal antibodies for the differentiation of hog cholera virus from other pestiviruses." *Veterinary Microbiology* 29: 101-108.
41. Edwards S., and Sands J.J. (1990) "Antigenic comparisons of hog cholera virus isolates from Europe, America and Asia Using monoclonal antibodies." *Dtsch. tierärztl. Wschr* 97: 57-104.
42. Enzmann, P.J. and Weiland, F. (1978). "Structural similarities of Hog Cholera virus with togaviruses". *Archives of Virology* 69: 77-78.
43. FAO, (1993). "Aislamiento Viral e inmunofluorescencia. Manual de Técnicas de Diagnóstico Viroológico". Red de Cooperación Técnica. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, pp. 12-44.
44. Ferrari M. (1992) "A tissue culture vaccine with lapinized chinese (LC) strain of hog cholera virus (HCV)." *Comp. Immun. Microbiol Infect Dis.* 15 (3): 221-228.
45. Florent A., Thomas, J and Leunen, J., (1969) "Contrôles des vaccins contre la peste porcine. Interet de Immunodepression pour la mise evidence de la virulence residuelle". *Bull. Off. Int Epizoot.*, 72: 665-669.
46. Fuchs, F., (1968). "Schweinepest". In: H Röhrer (Ed), *Handbuch der Virusinfektionen bei tieren*, Band III. Gustav Fischer Verlag, Jena, pp. 16-250.
47. Graham, R.C. Lindholm, U. and Kamovsky, M.J. (1965). "Cytochemical demonstration of peroxidase activity with 3-amino-9-ethylcarbazole". *J. Histochem. Cytochem.*, 13:150-152.
48. Greiser-Wilke I., Moennig V., Coulibaly C.O.Z., Dahle J., Leder L., and Liess B. (1990) "Identification of conserved epitopes on hog cholera virus protein." *Arch. Virol.* 111: 213-225.
49. Greiser-Wilke Y., Dittmar K.E., Liess B., and Moennig V. (1992) "Heterogeneous expression of the non-structural protein p80/p125 in cells infected with different pestiviruses." *J. Gen. Virol.* 73: 47-52.



50. Harding, J. D.J., Done, J.T. and Darbyshire, J.H., (1966). "Congenital tremors in piglets and their relation to swine fever". Vet. Rec., 79: 3 88-3 90.
51. Hawkes, R. (1982). "Identification of concanavalin A-binding proteins after sodium dodecyl sulfate-gel electrophoresis and protein blotting". Analytical Biochemistry 123:143-146.
52. Hitchcock P.J., and Brown T.M. (1983) " Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolisaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels." J. Bacteriology 154(1): 269-277.
53. Hohn Jensen, M., (1981) "Detection of antibodies against hog cholera virus and bovine viral diarrhea virus in porcine serum. A comparative examination using CF, PLA and NPLA assays". Acta. Vet. Scand., 22:85-98.
54. Horzinek, (1981). "Non-Arthropod-Borne. Togaviruses". New York: Academic Press. In: Leman, A., (1986). Disease of Swine. Cap. 17 Hog Cholera. Iowa State University Press, pp. 290-291.
55. Huck, R.A. and Aston, F.W., (1964). " The carrier sow in swine fever". Vet. Rec., 76: 1151-1154.
56. Hulst, N.M., Westra, D.F., Wensvoort, G. and Moormann R.J.M. (1993). "Glycoprotein EI of Hog Cholera virus expressed in insect cells protects swine from Hog Cholera". Journal of Virology 67(9): 5435-5442.
57. Jijl, M., Wensvoort, G., Kluyver, E. Hulst, M. Gulden, H., Gielkens, A., Berns, A., Moorman, R. (1991). "Live attenuated pseudorabies virus expression envelope glycoprotein EI of Hog Cholera virus protects swine against both Pseudorabies and Hog Cholera". J. Virol. 65(5) 2761-2765.
58. Kalb, V.F., and Bernlohr, R.W., (1977) "A new spectrophotometric assay for proteins in cell extracts". Anal Biochem. 82 : 362-371.
59. Kamijyo, Y., Ohkuma, S., Shimizu, M. and Shimizu, Y., (1976). "Effect of dexamethasone on the multiplication of attenuated strains of hog cholera virus in piglets". Microbiol., 1:475-477.
60. Kamijyo, Y., Ohkuma, S., Shimizu, M. and Shimizu, Y., (1977). "Differences in pathogenicity and antigenicity among hog cholera virus strains". Nat. Inst. Anim. Health Q., 17: 133-140.

61. Kamolsiriprichaiporn, S., Morrissy, C.J. and Westbury, H., (1992). "A comparison of the pathogenicity of two strains of hog cholera virus. 2 Virological Studies". Australian Veterinary Journal 69:10, pp 245-248.
62. Karden, V. and Glaner, M., (1982). "Zum Eintritt und zur Dauer der Immunität gegen Schweinepest nach aerogener Immunisierung". Arch. Exp. Veterinärmed., 36: 593-599.
63. Kom, G., (1964). "Über sensibilisierende Wirksamkeit sehr schwachvirulent nicht immunisierenden Schweinepestvirus sowie einer hochgradigen Virulenzsteigerung durch den sensibilisierten Organismus," Zentralbl. Veterinärmed. Beih., 11: 119-134.
64. Komaniwa, H., Fukusho, A. and Shimizu, Y., (1981). "Micromethod for performing titration and neutralization test of hog cholera virus using established porcine kidney strain" Nat. Inst. Anim. Health Q., 21: 153-158.
65. Korn, G. and Matthacus, W., (1977). "die Schweinepestkrankheit als virus-induzierte Störung des Enzymsystems: Zur Pathogenität von Peassuspensionen und Chymotrypsin (ogen). Zentralbl. Bakteriologie. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I. Orig. Reihe A, 238: 20-34.
66. Kresse, B.S., Stewart, W., Carbrey, E., Snyder, B. (1976). "Sensitivity of swine buffy coat culture to infection with Hog Cholera Virus". Am. J. Vet. Res. 37 (11):1315-1318
67. Kubin, G., (1967) "In vitro Merkmale des Schweinepestvirus". Zentralbl. Veterinärmed. Beih., 14: 542-543.
68. Kumagai T., Shimizu, T., Theda, S. and Matumoto, M., (1961). "A new in vitro method (END) for detection and measurement of hog cholera virus and its antibody by means of effect of HC-virus in swine tissue culture. I. Establishment of a standard procedure". J. Immunol., 87: 245-256.
69. Laemmli U.K. (1970) "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature 227: 680-685.
70. Laude H. (1978) "A direct plaque assay for hog cholera virus." J. Gen. Virol. 40: 225-228.
71. Launais, M. Aynaud, J.M., Corthier G., (1972). "Peste porcine classique: Propriétés d'un clone (souche Thiverval) isolé en culture cellulaire à basse température. Application dans la vaccination". Rev Med Vet (123):1537-1554.

72. Launais, M., Aynaud, J.M. and Corthier, G., (1978) "Hog cholera virus: Active immunization of piglets with the Thiverval strains in the presence and absence of colostral passive immunity". *Vet. Microbiol.*, 3: 31-43.
73. Lee, R.C.T., Wang, J.T., Lai, S.S., Wu, F.M. and Lin, T.T.C., (1982) "Studies on pre-colostral vaccination against hog cholera using an attenuated virus, LPC-China strain". *Proc. Intern. Pig Vet. Soc. Congr., México City*, p. 133.
74. Leunen, J. and Strobbe, R., (1977). "Capacity of attenuated swine fever vaccines to prevent virus carriers in the vaccinated pigs after contact with field virus". *Arch. Exp. Veterinacred.*, 31: 533-536.
75. Liess B, Röder, B., Eife K, Hirschert, K, Berger J, Bachamann, C., (1975). "Untersuchungen über die Europäische Schweinepest. V. Ermittlung inapparent infizierten Schweine in der Ferkelerzeugenbeständen in drei Ortschaften". *Berl Munch Tierarztl Wschr* (88):397-409.
76. Liess, B. and Prager, D., (1976). "Detection of neutralizing antibodies (NIF test): use of a new technical equipment (CCSC system) for laboratory swine fever diagnosis": In: CEC seminar on Diagnosis and Epizootiology of Classical Swine Fever. Amsterdam. EUR 5486, pp 187-197.
77. Liess, B., Frey. H.R., Prager, D., Hafez, S.M and Roeder, B., (1976). "The course of natural swine fever virus infection in individual swine and investigations on the development of inapparent SF infections" CEC seminar on Diagnosis and Epizootiology of Classical Swine Fever, Amsterdam EUR 5486, pp, 99-113. ,
78. Liess, B., Frey, H.R. and Prager, D., (1977). "Antibody response of pigs following experimental infections with strains of hog cholera and bovine viral diarrhea virus" In: CEC seminar on Hog Cholera/Classical Swine Fever and African Swine Fever, Hanover, EUR 5904, pp. 200-213.
79. Lin, T.T.C., Lai, S.S., Chen C.S, and Lee, R.C.T., (1982). "Immune response to different doses of LPC-China virus in pigs with different levels of colostral hog cholera antibody" *Proc. Intern Pig. Vet. Soc. Congr., México City*, p. 132.
80. Magar, R. Minocha F.L. and Lecomte, J. (1988) "Bovine Viral Diarrhoea virus proteins Heterogeneity of cytophathogenic and noncytophathogenic strains and evidence of a 53K glycoprotein neutralization epitope". *Veterinary Microbiology* 16: 303-314.
81. Mahnel H. and Mayr, A, (1974). "Schweinepest. Infektionskrankheiten und ihre Erreger". Band 16 VED Gustav Fischer Verlag, Jena.

82. Matheus, W. (1979). "Detection of three polypeptides in preparations of bovine viral diarrhea virus". *Archives of Virology* 59: 299-305.
83. Matheus, W. and Korn, G., (1966). "Scrumproteinveränderungen und klinische Symptome bei verschiedenen Verlaufsformen der Schweinepest". *Zentralbl. Veterinaermed. Beih.*, 13, 558-569.
84. Mendoza, E.S. (1995). "Fiebre Porcina Clásica: Investigación actual y perspectiva de un desarrollo tecnológico aplicado al diagnóstico serológico". Tesis Doctoral U.N.A.M. F.E.S.-Cuautitlán.
85. Mendoza, E.S., Correa, G.P., Hernández B.E. y Ciprián, C.A. (1992). "Perspectiva de un Método de Diagnóstico Serológico rápido para Fiebre Porcina Clásica." XXI. Congreso Nacional Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos 1992, Acapulco, Gro., México, pp55.
86. Mendoza, E.S., Correa, G.P., Terpstra, C. Bloemraad, M., Hernández, B.E., y Ciprián, A.C. (1994). "Typing of Hog Cholera virus strains from various countries by using Monoclonal Antibodies". IPVS, Bangkok, Thailandia, pp. 81.
87. Mendoza, S., Correa, P., Ayala, G., Hernández, B. E., and Ciprián A. (1994). "Biological differences among field, reference and vaccinal strains of Hog Cholera". IPVS, Bangkok, Thailandia, pp.82
88. Mendoza, S., González, S, Garibay, J., Hernández, B.E., Ciprián, A. (1994). "Electron Microcopy study of different purified fractions of field, vaccine and reference strains of Hog Cholera". IPVS, Bangkok, Thailandia, pp.81
89. Mendoza, E.S., Aguilera, E., Colmenares, G., Hernández B.E. y Ciprián, C.A. (1994) "Analysis of bouyante density and ultraviolet of Hog Cholera strains". 13th Inter. Procc. Vet. Soc. Cong. Bangkok, Thailand, p. 85.
90. Mengeling W.L. and Cheville, N.F., (1968). "Host response to persistent infection with hog cholera virus". *Proc. Ann. Meeting U.S. Livestock San. Assoc.* 72: 283-295.
91. Mengeling, W.L. and Parker, R.A., (1969). "Pathogenesis of Chronic hog cholera host response", *Am. J. Vet. Res.*, 30: 409-417.
92. Mengeling, W.L., (1970). "Endogenous neutralization of virus during fatal hog cholera illness". *Am. J. Vet. Res.*, 31: 91-95.
93. Mengeling, W.L., Gutenkunst, D.E., Fernelius A.L. and Pirtle, E.C. (1973). "Demonstration of an antigen relationship between Hog Cholera and BVD virus

94. Van Oirschot, J. (1983). "Congenital infections with Togavirus". *Veterinary Microbiology* 8: 321-361.
95. Van Oirschot, J.T., (1980). "Persistent and inapparent infections with swine fever virus of low virulence. their effects on the immune system". Thesis, State University of Utrecht, 1980.
96. Van Oirschot, J.T., (1988). "Description of the virus infection. In: Classical Swine Fever and Related Virus Infections. Ed: B Liess. Martinus Nijhoff Publishing. Boston/Dordrecht/Lancaster. 1-25.
97. Van Oirschot (1992) "Hog cholera. In: Diseases of Swine. Ed: Allen D. Leman, Barbara E. Straw, William L. Mengeling, Sylvie D' Allaire, David J Taylor. 7<sup>th</sup> edition. Iowa State University Press/Ames Iowa, USA. 274-285
98. Van Oirschot (1999) "Classical Swine Fever (Hog cholera). In: Diseases of Swine. Ed: Allen D. Leman, Barbara E. Straw, William L. Mengeling, Sylvie D' Allaire, David J Taylor. 7<sup>th</sup> edition. Iowa State University Press/Ames Iowa, USA. 159-172.
99. Weiland, E., Ahl, R., Stark, R, Weiland F., Thiel, H (1992). "A second envelope glycoprotein mediates neutralization of a Pestivirus, Hog Cholera Virus". *Journal of Virology* 60(6): 3677-3682.
100. Wensvoort G., Terpstra C., Boonstra J., Bloemraad M., and Van Zaane D. (1986) "Production of monoclonal antibodies against swine fever virus and their use in laboratory diagnosis." *Vet Microbiol* 12: 101-108.
101. Wensvoort, G., Terspra, C., Kluyver, E.P.', Kragten, C. & Wamaar, J.C. (1989). "Antigenic differentiation of pestivirus strains with monoclonal antibodies against hog cholera virus". *Veterinary Microbiology* 21: 9-20.
102. Wensvoort, G., Boonstra, J., Bodzinga, B. (1990). "Inununoaffinity purification and characterization of the envelope protein E1 of Hog cholera virus". *Journal General Virology* 71:531-540.
103. Wilke G, Moening V., Coulibaly, C., Dahle, J., Leder, L. and Liess, B. (1990). "Identification of conserved epitopes on Hog Cholera virus protein". *Arch Virol* 111:213-225.
104. Young, GA., Kitchell, R.L., Luedke, A.J. and Sautter, J.H., (1955). "The effect of viral and other infections of the dam on fetal development in swine. I. Modified live hog cholera viruses immunological, virological and gross pathological studies". *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 126: 165-171.

105. González C., Pijoan C., Ciprian A., Correa P. and Mendoza S. (2000) "The effect of vaccination with the PAV-250 Strain classical swine fever (CSF) virus on the airborne transmission of CSFvirus" *J. Vet. Med. Sci.* 63(9): 991-996.
106. Van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.A.M., Bishop D.H.L., Corstens E. B., Estes M.I.C., Moniloff S.M., Mayo M.A., Mc Geoch D.J., Peringle C.V., Wickner R.B., (2000) "Virus Taxonomy: Seven report of the international committee of taxonomy of virus" Academic Press.