



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DETERMINACION DE LA PRESENCIA DEL VIRUS DE FIEBRE
PORCINA CLASICA EN LAS FRACCIONES SOLIDAS Y
LIQUIDAS DE EXCRETAS PORCINAS POR MEDIO DE LAS
PRUEBAS DE INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA,
INMUNOPEROXIDASA DIRECTA Y ELISA DE CAPTURA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :
JUAN FRANCISCO QUEZADA MONROY



ASESORES: MC. ROBERTO G. MARTINEZ GAMBA
MC. GERARDO RAMIREZ HERNANDEZ
MC. MARIA DEL CARMEN MERCADO GARCIA

MEXICO, D. F.

2004



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.

DEDICATORIA

**"Madurez quiere decir que tu ya tienes la vida en tus manos,
una educación, un sentido de vida descubierto,
una ética autónoma y un trabajo y un auto propio"**

Virginia Woolf

A MI MADRE

**Por que me diste la vida, por tu amor,
tu ejemplo ante situaciones difíciles, tus desvelos,
tu esfuerzo para que llegara a este momento,
por todos los sacrificios hechos.**

GRACIAS MADRE

AGRADECIMIENTOS

Dr. Gerardo Ramírez Hernández

**Por tus consejos, tu apoyo, tu paciencia, por todo lo
que me has enseñado y sobre todo por tu amistad.**

Dra. Otilia Zamittiz Pacheco

Por todo lo que me has dado.

Dr. Gerardo López Buendía

Gracias por el apoyo recibido durante todos estos años.

A mis tutores

MC. Roberto G. Martínez Gamba

MC. María del Carmen Mercado García

Por su apoyo para la realización de esta tesis y por su paciencia.

Al personal del Departamento de Producción Porcina

Dra. María Elena Trujillo, M.C. Alejandra Mercadillo, Dr. Mario Haro,

M.C. Rosalba Carreón, M.C. Esperanza Galván.

Por su apoyo, por todo lo que me han enseñado, por su ayuda y amistad.

Al personal del Centro de Cómputo

Víctor Hernández, Nora Galván, Guillermo Salazar, Luis Miguel Chávez,

Candelaria Arana

Por su amistad y por prestarme su ayuda cuando la necesite.

Gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México por la confianza, la

oportunidad de formar parte de ella y la formación recibida.

Gracias a todos los profesores de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

por sus conocimientos y experiencia.

CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESUMEN.....	1
I INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 Historia.....	5
1.1.1 Distribución de la enfermedad en México.....	7
1.1.2 Etiología.....	9
1.1.3 Epidemiología.....	10
1.1.4 Patogenia.....	11
1.1.5 Signos clínicos.....	12
1.1.6 Lesiones.....	15
1.1.7 Prevención.....	19
1.1.8 Diagnóstico diferencial.....	19
1.1.9 Pruebas diagnósticas.....	19
1.2 Justificación.....	21
1.3 Hipótesis.....	22
1.4 Objetivo.....	23
II MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
2.1 Localización.....	24
2.1.2 Granjas evaluadas.....	24
2.1.3 Muestras.....	25
2.1.4 Procedimiento experimental.....	27
2.1.5 Recuperación del virus.....	27
2.1.6 Cultivo celular.....	28
2.1.7 Inmunofluorescencia directa.....	29
2.1.8 Inmunoperoxidasa directa.....	30
2.1.9 ELISA de captura.....	31
2.1.10 Análisis estadístico.....	32
III RESULTADOS.....	33
IV DISCUSIÓN.....	39
V CONCLUSIONES.....	44
VI LITERATURA CITADA.....	45
Anexos.....	50

LISTA DE TABLAS

	<u>Página</u>
Tabla 1. Tiempo de inactivación para varios virus porcinos en estiércol líquido a diferentes temperaturas.....	5
Tabla 2. Vida media (horas) del virus de fiebre porcina clásica (vFPC) en relación al pH y la temperatura.....	11
Tabla 3. Características de las 10 granjas evaluadas.....	24
Tabla 4. Cantidad de muestras por granja y total de las mismas.....	27
Tabla 5. Valores en porcentaje para la prueba de ELISA de captura.....	31
Tabla 6. Número de muestras del cárcamo que fueron analizadas por la prueba de inmunoperoxidasa.....	32
Tabla 7. Número de muestras del separador que fueron analizadas por la prueba de inmunoperoxidasa.....	34
Tabla 8. Número de muestras del sólido que fueron analizadas por la prueba de inmunoperoxidasa.....	34
Tabla 9. Número de muestras del cárcamo que fueron analizadas por la prueba de inmunofluorescencia.....	36
Tabla 10. Número de muestras del separador que fueron analizadas por la prueba de inmunofluorescencia.....	36
Tabla 11. Número de muestras del sólido que fueron analizadas por la prueba de inmunofluorescencia.....	37
Tabla 12. Presencia del vFPC a partir de muestras del cárcamo, separador y sólidos, utilizando la prueba de ELISA de captura.....	38

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Situación Epizootiológica y avances de la Campaña Nacional para la Erradicación de la Fiebre Porcina Clásica.....	8
Figura 2. Fotografía del virus de Fiebre Porcina Clásica por microscopía electrónica.....	9
Figura 3. Presencia de conjuntivitis y exudado	13
Figura 4. Cerdos que presentan diarrea de color amarillento grisáceo.....	13
Figura 5. Al tener fiebre, los animales buscan una fuente de calor y se les observa amontonados.....	13
Figura 6. Cerdo con cifosis (espalda arqueada).....	14
Figura 7. Feto momificado.....	15
Figura 8. Riñón de cerdo con hemorragias petequiales.....	16
Figura 9. Hemorragias en un linfonódulo mandibular.....	16
Figura 10. Infartos en el bazo.....	17
Figura 11. Necrosis de tonsilas	17
Figura 12. Ulceras botonosas en el ciego y colon.....	18
Figura 13. Separador de sólidos de tipo cilíndrico.....	25
Figura 14. Separador de sólidos de tipo cascada.....	25
Figura 15. Del lado izquierdo en la parte superior se observa el control positivo y el negativo en la parte inferior. Del lado derecho se observan las muestras que resultaron negativas por la prueba de inmunoperoxidasa.....	35

RESUMEN

QUEZADA MONROY JUAN FRANCISCO. Determinación de la presencia del virus de Fiebre Porcina Clásica en las fracciones sólidas y líquidas de excretas porcinas por medio de las pruebas de inmunofluorescencia directa, inmunoperoxidasa directa y ELISA de captura (bajo la asesoría de los MC. Roberto G. Martínez Gamba, Gerardo Ramírez Hernández, Carmen Mercado García)

El presente estudio tuvo como objetivo detectar la presencia del virus de Fiebre Porcina Clásica (vFPC) a partir de residuos orgánicos. Se evaluaron un total de 122 muestras de material de cárcamo de recolección, excretas sólidas y líquidas separados de 10 granjas ubicadas en la región central de México, las cuales tienen implementado un sistema de tratamiento de excretas por medio de un separador de sólidos y líquidos. Todas las muestras se evaluaron por medio de las pruebas de inmunofluorescencia directa, inmunoperoxidasa directa y ELISA de captura para evidenciar la presencia del vFPC. En el caso de la inmunoperoxidasa se evaluaron 122 muestras y 112 para la prueba de inmunofluorescencia, todas las muestras resultaron negativas a la presencia del virus. En relación a la prueba de ELISA de captura se trabajaron 44 muestras de las cuales 42 resultaron negativas (95.45%) y 2 resultaron positivas (4.55%). Las 2 muestras positivas pertenecieron a la Granja 1 ubicada en el estado de Guanajuato, estas correspondieron al cárcamo y a los sólidos, para las cuales se obtuvo una densidad óptica de 53.96% y 50.49% respectivamente. El virus de Fiebre Porcina Clásica puede ser aislado a partir excretas porcinas sólidas y de muestras del cárcamo. La prueba de ELISA de captura resultó ser más sensible debido a su capacidad para detectar proteínas específicas del vFPC. Las pruebas de inmunoperoxidasa directa e inmunofluorescencia directa no detectaron al virus.

Introducción

El estiércol de corral es una mezcla de excretas y materiales de cama, que son suficientemente densos para ser manejados como sólidos. El estiércol líquido, sin embargo, es una mezcla de heces y orina, las cuales también pueden estar mezcladas con agua limpia y de lluvia, además de contener pequeñas cantidades de material de cama y alimento¹.

En el pasado, el llenado de estercoleros con estiércol de corral generaba temperaturas suficientemente altas para destruir a los patógenos. En la actualidad, la mayor parte de las granjas porcinas tecnificadas emplean sistema de limpieza basados en el arrastre hidráulico de las excretas, lo que ha alterado la composición de las mismas, por lo tanto los procesos microbianos termofílicos no pueden ser una garantía para la destrucción de patógenos durante el almacenamiento de las excretas en un estercolero¹.

Por otro lado, el estiércol líquido no genera un proceso de fermentación lo suficientemente efectivo como para destruir a los posibles agentes infecciosos y probablemente algunas de las enfermedades pueden ser diseminadas por este tipo de estiércol¹.

A partir del establecimiento de la Norma Oficial Mexicana (NOM-001-ECOL-1996) y para cumplir con las especificaciones de ésta en relación a las descargas a partir de granjas porcinas, se ha implementado en muchas granjas porcícolas de México el sistema de separación sólido-líquido y el posterior tratamiento de estos últimos en lagunas de oxidación aeróbicas, anaeróbicas o facultativas. La actual normatividad es mejor atendida por los porcicultores que pertenecen al estrato tecnificado, por su capacidad para establecer en sus granjas diferentes tecnologías y reducir el impacto ambiental de las excretas. Sin

embargo, los productores que pertenecen al estrato semitecnificado tienen limitaciones técnicas y económicas para realizar esta actividad^{2,3}.

Todo lo anterior ha traído consigo la obtención de un producto del proceso que son los sólidos separados, los cuales son especialmente ricos en nutrimentos por la alta concentración de los mismos en las dietas para cerdos, y por la pobre digestión de los mismos que realiza esta especie. Uno de los métodos que se emplean para el manejo y el aprovechamiento de la parte sólida del estiércol porcino, es su incorporación en las raciones de rumiantes o de los mismos cerdos. Si bien, se ha demostrado que el estiércol sólo tiene valor equivalente al de un forraje y no es una fuente importante de suministro de energía o proteína, su costo lo hace una materia prima atractiva para muchos productores⁴.

El aprovechamiento de las excretas porcinas para la alimentación tanto de cerdos como de rumiantes sin un tratamiento biológico o químico es común en algunas granjas, aunque se recomienda una previa fermentación para garantizar un producto libre de microorganismos patógenos, ya que se ha reportado la sobrevivencia de algunos virus en heces de cerdo; tal es el caso del virus de la Fiebre Porcina Africana que sobrevive 60 a 100 días, el de la Enfermedad de Aujeszky de 3 a 15 semanas, el de la Fiebre Aftosa de 21 a 103 días y el Parvovirus Porcino por 14 semanas^{1, 4, 5, 6}.

Un estudio realizado con ensilados de excretas porcinas a los cuales se les inocularon los virus de la Enfermedad de Aujeszky y de Ojo Azul, se evidenció la presencia del primero a los 60 minutos después de la inoculación y del segundo a los 60 minutos y 24 horas post inoculación, pero no a las 72 horas⁷.

Otros virus, como el Rotavirus porcino, el cual causa diarrea en lechones de 2 a 4 semanas, se transmite por vía orofecal y se excreta en heces por largos periodos de tiempo, incluso por las hembras gestantes; este virus presenta una relativa resistencia a los desinfectantes y a variaciones de temperatura. Se sabe poco acerca de la viabilidad del virus en heces a bajas temperaturas pero la conserva por 7-8 meses a 18-20° C. En el estudio realizado por Doris Ramos *et al*⁸, el Rotavirus porcino se mantuvo viable en heces por 32 meses a 10° C.

Los Adenovirus se transmiten muy probablemente por vía orofecal. El virus es excretado en heces en su mayoría por cerdos destetados, los adultos raramente excretan el virus pero tienen altos niveles de anticuerpos séricos⁹.

En el caso de los Enterovirus, estos son estables a pH entre uno y nueve, resistentes a muchos desinfectantes, pero solo el hipoclorito y el etanol al 70% los inactivan completamente¹⁰.

El virus de la enfermedad de Teschen sobrevive por más de 168 días a 15° C. Se mantiene viable por largos periodos de tiempo en estiércol líquido pero es inactivado si el estiércol es aireado; también se inactiva en estiércol líquido por radiaciones ionizantes y por digestión anaeróbica¹⁰.

En el Tabla 1 se muestran los tiempos de inactivación en estiércol líquido a diferentes temperaturas de algunos virus que afectan a los cerdos.

Otros virus que pueden permanecer viables en el estiércol son: el Circovirus Porcino, el virus de la Diarrea Epidémica Porcina y el virus que causa la Fiebre Porcina Clásica.^{11, 12}

Tabla 1. Tiempo de inactivación para varios virus porcinos en estiércol líquido a diferentes temperaturas¹¹.

Virus	Origen estiércol	Concentración Inicial (TCID ₅₀ /μl)	Tiempo de inactivación bajo diferentes temperaturas						
			5° C	20° C	35° C	40° C	45° C	50° C	55° C
Influenza Porcina	Porcino	10 ^{5.8}	9 semanas	2 semanas	>24 hrs.*	>24 hrs.*	ND	>2hrs. 30 min.	1 hora
Parvovirus Porcino	Porcino	10 ^{6.0}	>40 semanas*	>40 semanas*	21 semanas	9 semanas	19 días*	5 días	8 días
Aujeszky	Porcino	10 ^{5.2}	15 semanas	2 semanas	5 hrs.	2hrs.	45 min.	20 min.	10 min.
Fiebre Porcina Clásica	Porcino	10 ^{4.2}	>6 semanas*	2 semanas	4 hrs.	>3 hrs.*	>3 hrs.*	**	**
Gastroenteritis transmisible	Porcino	10 ^{5.2}	>8 semanas*	2 semanas	24 hrs.	>5 hrs.*	2 hrs. 30 min.	1 h	30 min.

TCID₅₀: 50% dosis infectiva en cultivo celular

ND: no registrado

* El tiempo de inactivación completa no se alcanza

** Instantáneo

Fiebre Porcina Clásica

Historia

La Fiebre Porcina Clásica (FPC) es una enfermedad viral altamente contagiosa que afecta a los cerdos, presentando una alta morbilidad y mortalidad. La primera descripción de la enfermedad se realizó en Tennessee, Estados Unidos (E.U.) en el año de 1810. Los primeros brotes fuera de E.U. se presentaron en Inglaterra en el año de 1862 para luego diseminarse por todo el continente europeo. Fue reportada en América del sur y sur de África en los años de 1899 y 1900 respectivamente. La Organización Internacional de Epizootias (OIE) tiene incluida a esta enfermedad en la Lista A debido a que la considera una enfermedad altamente transmisible y de rápida diseminación, además de tener un impacto en el comercio de animales y sus derivados. Actualmente es una enfermedad de distribución mundial con la excepción de los siguientes países: Australia, Bélgica, Inglaterra, Irlanda, Islandia, Nueva Zelanda, Portugal, Países Escandinavos, Panamá, Chile, Uruguay, Suiza, Canadá y Estados Unidos^{14, 15, 16}.

En el caso de México, la enfermedad fue introducida en el año de 1876 por la importación de ganado porcino proveniente de Estados Unidos. La falta de un programa de campaña en nuestro país permitió que esta enfermedad se diseminara en todo el territorio nacional, principalmente en la zona porcícola del Bajío donde se convirtió en una enfermedad enzoótica que merma la economía de los productores¹⁷.

En 1973 se inician de manera conjunta y organizada las actividades para estructurar un programa de control en el noroeste de México, sin embargo es hasta el año de 1980 en el que mediante acuerdo del C. Secretario de Agricultura y Recursos Hidráulicos, se establece en el territorio nacional de manera obligatoria y permanente, la Campaña para el Control y Erradicación de la Fiebre Porcina Clásica. En 1983 se publica en el Diario Oficial de la Federación la declaración de libres de FPC de 58 municipios del norte de Sonora. En 1990 la Secretaría pone a consideración de productores, industriales, médicos veterinarios especialistas y organismos vinculados con la porcicultura, el nuevo programa de campaña¹⁷.

En el año de 1991 se publica en el Diario Oficial de la Federación el Acuerdo mediante el cual se declara libre de FPC la región sur del estado de Sonora, por lo que se procedió a gestionar ante el Gobierno de los Estados Unidos su reconocimiento a fin de establecer el intercambio comercial con dicho país y Canadá, el 29 de octubre de 1996 se publica en el Diario Oficial de la Federación, la Norma Oficial Mexicana NOM-037-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Fiebre Porcina Clásica, la cual es de observancia obligatoria y tiene por objeto diagnosticar, prevenir, controlar y erradicar la FPC en todo el país. El 28 de octubre de 1997 las gestiones realizadas por nuestro país tienen éxito y el estado de Sonora

obtiene el reconocimiento de libre por los socios comerciales del Tratado de Libre Comercio de Norteamérica¹⁷.

Debido a los avances significativos obtenidos en esta campaña y a la viabilidad de su erradicación, el 18 de diciembre de 1997 se publica el Acuerdo mediante el cual se amplía en el territorio nacional el Dispositivo Nacional de Emergencia de Sanidad Animal (DINESA) con objeto de diagnosticar, prevenir, controlar y erradicar la Fiebre Porcina Clásica¹⁷.

Distribución de la enfermedad en México

De acuerdo a la situación actual de la Campaña Nacional contra la Fiebre Porcina Clásica, México se encuentra dividido en (Figura 1):

a) Zona libre: Baja California, Baja California Sur, Chihuahua, Campeche, Coahuila, Comarca Lagunera, Durango, Nayarit, Nuevo León, Quintana Roo, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, y Yucatán¹⁷.

En la fase libre se realiza el control de la movilización de cerdos, productos y subproductos, vigilancia epizootiológica, monitoreo serológico permanente, prohibición de la vacunación y del uso de escamocha para la alimentación de cerdos, notificación y erradicación de los posibles focos que pudieran presentarse¹⁷.

b) Zona de erradicación con vacunación: Aguascalientes, Colima, Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Veracruz y Zacatecas¹⁷.

En la fase de erradicación con vacunación se realiza el control de la movilización de cerdos, productos y subproductos, la vigilancia epizootiológica, el reforzamiento del

sistema de control cuarentenario y se debe de contar con un fondo contingente o de aseguramiento para emergencias en casos de brotes, queda prohibido el uso de escamocha para la alimentación de cerdos y la vacunación de cerdos se realiza de manera controlada¹⁷.

Al momento de la impresión de esta tesis la zona de erradicación con vacunación cambiará a zona de erradicación.

c) Zona de control: Chiapas, Distrito Federal, Estado de México, Guerrero, Hidalgo, Morelos, Oaxaca, Tabasco y Tlaxcala¹⁷.

En la fase de control se lleva a cabo la vacunación intensiva de cerdos, a través de DINESA en explotaciones de traspatio y se promueve en tecnificadas. El control de la movilización de cerdos, productos y subproductos de origen porcino, la vigilancia epizootiológica, notificación de focos, diagnóstico de casos, control de brotes y el monitoreo de pjaras. Asimismo el consumo de escamocha se autoriza siempre y cuando sea sometida a cocción por 30 minutos a 100° C¹⁷.



Figura 1. Situación Epizootiológica y avances de la Campaña Nacional para la Erradicación de la Fiebre Porcina Clásica.

Específicamente en México, la presencia del vFPC en las excretas porcinas puede ser un factor de riesgo en algunas zonas del país donde está presente esta enfermedad, además de que esta enfermedad constituye uno de los factores que limitan el desarrollo de la porcicultura nacional y restringe las posibilidades de exportación, ya que diversos países interesados en la adquisición de carne de cerdo producida en el país, condicionan los tratados comerciales a la ausencia de dicha enfermedad.

Etiología

El vFPC (Figura 2) pertenece a la familia Flaviviridae, género Pestivirus, que se encuentra relacionado antigénicamente con el virus de la Diarrea Viral Bovina (vDVB) y con el virus de la Enfermedad de las Fronteras (vEF). Tiene un diámetro de 40-50nm con una nucleocápside de 29nm. Es un virus RNA envuelto con una membrana isométrica en el centro. Presenta proyecciones de 6-8nm en la superficie del virión. Su densidad es de entre 1.12-1.17 g/mL además de tener un coeficiente de sedimentación de 140-180 S.^{14, 18}

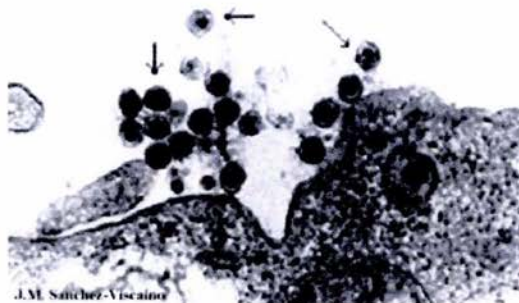


Figura 2. Fotografía del virus de Fiebre Porcina Clásica por microscopía electrónica.¹⁹

Los Pestivirus se pueden clasificar en dos biotipos de acuerdo a los cambios morfológicos que se suceden durante el crecimiento viral en un cultivo celular; los no citopatogénicos se replican sin mostrar efectos visibles mientras que los virus citopatogénicos ocasionan una lisis de las células. En el caso del vFPC la mayoría son no citopatogénicos.¹⁸

El vFPC en relación a su grado de virulencia se divide en cepas de alta, moderada y baja virulencia. Las cepas de alta virulencia inducen una infección aguda y ocasiona una alta mortalidad. Las cepas de moderada virulencia provocan una infección crónica y las de baja virulencia inducen una infección subclínica.²⁰

Los tiempos de infección también varían según el tipo de cepa, en las de alta y moderada virulencia el tiempo de infección es después del nacimiento; en el caso de las de baja virulencia la infección se presenta durante la etapa fetal.²⁰

Epidemiología

El vFPC sobrevive en el estiércol por un tiempo prolongado y algunos estudios sugieren que la inactivación ocurre de forma más rápida en la fase líquida del estiércol que en la fase sólida. En el estiércol líquido sobrevive por un mínimo de 70 días a 17° C y por 84 días a 4° C. Además el virus unido al sólido puede ser protegido contra la inactivación^{1, 14, 15}.

En el Tabla 2 se observa el efecto de la combinación de diferente pH y temperatura sobre la vida media del vFPC.

La supervivencia de este virus en el medio ambiente es afectada por muchas variables físicas o químicas como son la temperatura, humedad, pH, presencia de materia orgánica y la luz ultravioleta, la cual lo inactiva rápidamente¹⁵.

Tabla 2. Vida media (horas) del vFPC en relación al pH y la temperatura¹⁵.

Temperatura	pH 3.0	pH 3.5	pH 4.0	pH 7.0
4° C	70 (25-118)	174 (156-197)	260 (224-299)	n*
21° C	5 (5-6)	5 (4-5)	11 (10-14)	50 (24-77)
37° C	n*	n*	0.7	7

Los datos son presentados en promedios por hora y entre paréntesis se muestran los rangos.

* El valor no fue determinado

Este agente puede permanecer viable en carne congelada por más de 85 días, los tratamientos de ahumado y curado no parecen inactivarlo por lo que sobrevive entre 17 y 188 días. Es inactivado por pasteurización y cocción, al tratar la carne por un minuto a 71° C y 30 minutos a 65° C, pero a 62.5° C por 30 minutos el virus permanece activo. Es estable en pH de entre 4 y 10. Al ser un virus envuelto presenta sensibilidad al éter, cresol, formalina (1%), cloroformo, fenol, cuaternarios de amonio, aldehídos (glutaraldehídos y formaldehído) e hidróxido de sodio al 2% ^{1,15}.

La FPC se transmite principalmente por contacto directo entre cerdos infectados y cerdos susceptibles a través de secreciones, excreciones, semen, sangre; pero también se puede transmitir a través de ropa, vehículos, equipo, canales y productos procesados; otra forma de transmisión es el uso de desperdicios de cocina en la alimentación de los cerdos¹.

Patogenia

El virus entra por vía oronasal, en ocasiones también por la conjuntiva, mucosa genital e incluso por abrasiones presentes en la piel. Una vez que el virus entra en el huésped, este se replica en las células epiteliales de las criptas tonsilares, siendo este el sitio primario de

replicación. De la tonsila el virus es llevado vía vasos linfáticos a los nódulos linfáticos que drenan la región tonsilar (mandibular, retrofaríngeos y parotídeos). Una vez que llega a nódulos linfáticos se replica y pasa a la corriente sanguínea periférica por donde se disemina a bazo, médula ósea, placas de Peyer, nódulos linfáticos viscerales, vejiga, riñones y encéfalo. En caso de infectar a hembras durante la gestación, el virus atraviesa la barrera placentaria y puede causar momias, abortos, mortinatos e incluso la tolerancia inmunológica^{14,20}.

Signos clínicos

Esta enfermedad tiene varias presentaciones:

La presentación aguda se caracteriza por un corto periodo de incubación, los animales presentan signos como son depresión, fiebre (42° C), anorexia, los ojos muestran una marcada descarga asociada a conjuntivitis (Figura 3) la cual puede progresar hasta que los párpados estén completamente adheridos, constipación seguida por una severa diarrea acuosa de color amarillenta grisáceo (Figura 4), el vómito es poco común, y se presenta como un fluido de color amarillento debido a una alta concentración de bilis. Los animales se amontonan (Figura 5), presentan convulsiones, incoordinación de los cuartos traseros y una cierta coloración púrpura en abdomen, hocico, parte media de las piernas y orejas. Otro hallazgo importante es la disminución de la cuenta leucocitos, que baja hasta 3000/mm³, siendo la cuenta normal de 11-22000. La muerte se presenta entre los 10 y 20 días¹⁴.



Figura 3. Presencia de conjuntivitis y exudado²¹.



Figura 4. Cerdos que presentan diarrea de color amarillento grisáceo.



Figura 5. Al presentar fiebre los animales buscan una fuente de calor y se les observa amontonados.

La presentación crónica tiene un corto periodo de incubación y se divide en tres fases: la primera fase se caracteriza por depresión, fiebre, anorexia y leucopenia; la segunda por una recuperación clínica y la tercera por una exacerbación de los signos como son anorexia, depresión, aumento en la temperatura corporal, retraso en el crecimiento, lesiones en piel y los animales frecuentemente permanecen con la espalda arqueada (Figura 6), la muerte se presenta entre uno y tres meses¹⁴.



Figura 6. Cerdo con cifosis (espalda arqueada)²².

La presentación congénita puede tener como resultado abortos, momificaciones (Figura 7), malformaciones, nacidos muertos cuando la infección se presenta en las primeras etapas de la gestación¹⁴.

Cuando la infección ocurre entre los 50-70 días de la gestación, puede inducir el nacimiento de lechones con una viremia persistente, permaneciendo clínicamente sanos al momento del nacimiento y sobrevivir por varios meses. Después del nacimiento pueden presentar anorexia, retraso en el crecimiento, depresión, conjuntivitis, dermatitis, diarrea, problemas locomotores hasta llegar a la paresis posterior y tremor congénito, Este curso de la enfermedad es denominada *Late-on-set* (sistema retardado). Estos animales de manera

constante eliminan grandes cantidades de virus y son un reservorio de la enfermedad. Los animales llegan a sobrevivir más de 6 meses pero eventualmente mueren^{14, 22}.

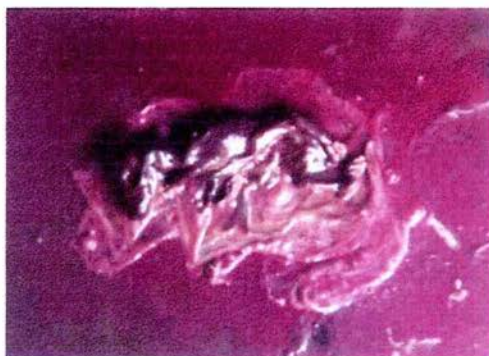


Figura 7. Feto momificado.

Lesiones

Se observan hemorragias de varios tamaños causadas por la degeneración hidrópica y necrosis de células endoteliales del sistema vascular en conjunción con defectos en el mecanismo de coagulación. Reacciones inflamatorias catarrales, fibrinosas y hemorrágicas están presentes en el aparato digestivo, respiratorio y urogenital. Las hemorragias en los riñones (Figura 8) pueden ser de varios tamaños desde petequiales hasta equimóticas, estas se presentan en la superficie de la corteza. Las petequiales también pueden ser observadas en la vejiga, laringe, epiglotis, corazón, mucosa intestinal y piel. La piel puede llegar a estar cianótica^{11, 14}.



Figura 8. Riñón de cerdo con hemorragias petequiales²⁴.

Los nódulos linfáticos llegan a estar edematosos, aumentados de tamaño y hemorrágicos; la presencia de las hemorragias difusas les dan un aspecto veteado (Figura 9)¹⁴.

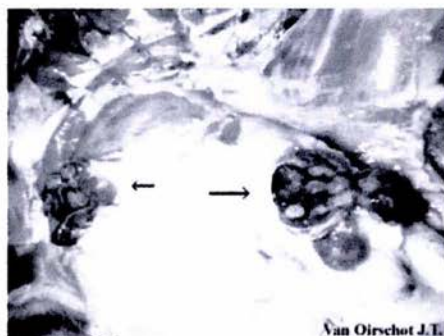


Figura 9. Hemorragias en un linfonódulo mandibular¹⁴.

Por efecto de una trombosis que obstruye el flujo sanguíneo en los capilares se observan infartos en diferentes órganos. La trombosis puede ser causada por una degeneración hidrópica de las células endoteliales con tendencia de los eritrocitos a agruparse. Los infartos en el bazo son oscuros de varios tamaños, levantados levemente sobre la superficie

(Figura 10). También se observan infartos en vejiga y tonsila (Figura 11), en este último órgano también causa necrosis o una tonsilitis supurativa¹⁴.

Se puede observar infartos y hemorragias en el pulmón en la fase aguda de la enfermedad. Como consecuencia de infecciones bacterianas secundarias se puede desarrollar una pleuritis y bronconeumonía de catarral a fibrinosa. El corazón puede estar flácido y presentar congestión del miocardio¹⁴.



Figura 10. Infartos en el bazo²⁴.



Figura 11. Necrosis en tonsilas²⁵.

En los animales que mueren por esta enfermedad el estómago se encuentra vacío excepto por la presencia de bilis y de pequeñas cantidades de alimento. El fondo está marcadamente congestionado y hemorrágico, la superficie de la mucosa puede contener petequias y erosiones que van de medianas a severas, una enteritis catarral moderada o necrótica puede estar presente en el intestino. En el ciego y en el colon se puede presentar necrosis y ulceraciones en forma botón (Figura 12) ¹⁴.

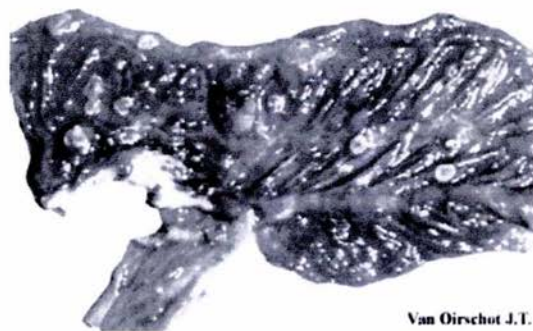


Figura 12. Ulceras botonosas en el ciego y en el colon¹⁴.

En un porcentaje alto de los casos se presenta un infiltrado perivascular de linfocitos o células polimorfonucleares con proliferación de células endoteliales, microgliosis y necrosis focal¹⁴.

En la infección persistente se presenta una atrofia del timo y una disminución severa de linfocitos y células germinales en órganos linfoides periféricos¹⁴.

En una infección crónica puede haber plasmocitosis y glomerulonefritis¹⁴.

Las lesiones crónicas en las costillas son causadas por una repentina calcificación de células cartilaginosas maduras¹⁴.

Prevención

Los cerdos nacidos de hembras vacunadas son protegidos por 5-8 semanas contra la mortalidad pero no contra la replicación y la diseminación del virus. La vacunación se realiza a las 6 semanas de vida y para elevar la inmunidad del hato se revacuna a los 5 meses¹⁴.

Diagnósticos diferenciales

Algunas enfermedades pueden ser confundidas con la FPC, entre ellas: Enfermedad de Aujeszky, erisipela porcina, salmonelosis, pasterelosis (neumonía), envenenamiento con warfarina, cualquier causa que ocasione abortos, momificaciones, nacidos muertos o lechones débiles, enfermedad del corazón de mora, trombocitopenia purpúrea, fiebre porcina africana y encefalomielitis viral²⁶.

Pruebas diagnósticas

El diagnóstico está basado en la detección del antígeno, aislamiento viral y la demostración de anticuerpos. Algunos métodos de diagnóstico son la inmunofluorescencia directa e indirecta, ya sea en cultivo celular o en cortes de criostato (tonsila, ganglio, bazo), inmunoperoxidasa para la detección del virus como de anticuerpos. Estas pruebas utilizan anticuerpos policlonales contra el vFPC; la prueba de ELISA para la detección de anticuerpos como del virus. Esta última se denomina ELISA de captura y detecta proteínas específicas del vFPC como es la glicoproteína E0; el de exaltación del virus de la enfermedad de Newcastle (END), el de interferencia, RT-PCR y la seroneutralización, que se considera la prueba más sensible y específica para la detección de anticuerpos, aunque pudieran haber sido inducidos por el virus que causa la diarrea viral bovina, para lo cual los

sueros serían probados para la detección de anticuerpos específicos contra esta enfermedad^{18, 26}.

Justificación

Los agentes causales de casi todas las enfermedades virales y bacterianas son eliminados ya sea por heces u orina; este material es recolectado formando así el estiércol. Por esta razón el estiércol juega un papel importante en la diseminación de las enfermedades infecciosas. La identificación del virus de Fiebre Porcina Clásica en el estiércol es por lo tanto importante¹.

Hipótesis

El virus de la Fiebre Porcina Clásica no sobrevive en estiércol líquido, en sólidos y líquidos separados.

Objetivo

- 1.- Determinar la presencia del virus de la Fiebre Porcina Clásica en excretas porcinas líquidas del cárcamo de recolección, en la fracción sólida y líquida separados de 10 granjas porcinas ubicadas en la región central de México.
- 2.- Comparar diferentes técnicas de diagnóstico para la identificación del vFPC a partir de excretas porcinas.

Materiales y Métodos

Localización

El análisis de las muestras se llevó a cabo en el Departamento de Producción Animal: Cerdos, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Granjas evaluadas

Se utilizaron muestras de excretas sólidas y líquidas de 10 diferentes granjas localizadas en 5 estados de la región central de México que tienen un separador de sólidos y líquidos, y que además vacunan contra FPC. Las características de las granjas se muestran en el Tabla 3.

Tabla 3. Características de las 10 granjas evaluadas

No. granja	Estado	No. animales totales	Vacunación contra FPC	Tipo separador	Tipo de zona*
Granja 1	Guanajuato	4,000	√	Cilindrico (Figura 14)	Erradicación con vacunación
Granja 2	Guanajuato	7,500	√	Cilindrico	Erradicación con vacunación
Granja 3	Guanajuato	9,000	√	Cilindrico	Erradicación con vacunación
Granja 4	Edo. De Mex.	2,800	√	Cascada (Figura 15)	Control
Granja 5	Morelos	1,450	√	Cascada	Control
Granja 6	Edo. De Mex.	3,508	√	Cascada	Control
Granja 7	Puebla	1,500	√	Cilindrico	Erradicación con vacunación
Granja 8	Puebla	5,000	√	Cilindrico	Erradicación con vacunación
Granja 9	Querétaro	6,000	√	Cascada	Erradicación con vacunación
Granja 10	Querétaro	1,200	√	Cascada	Erradicación con vacunación

*Estatus de la granja al momento del muestreo. Fecha de muestreo: octubre de 2000



Figura 13. Separador de sólidos de tipo cilíndrico.



Figura 14. Separador de sólidos de tipo cascada³⁰.

Muestras

De cada granja se colectaron 200ml de material del cárcamo de recolección a partir de cinco lugares diferentes, hasta completar 1 litro de muestra. Una vez obtenido el primer litro se realizó el mismo procedimiento para la obtención de un segundo litro. Las muestras se depositaron en recipientes de vidrio estériles, se identificaron y se transportaron en una caja de poliuretano con refrigerantes.

Del aparato de separación de sólidos y líquidos se tomaron pequeñas muestras a intervalos de 5 minutos hasta completar 1 litro, la muestra se tomó directamente de la manguera que conduce el efluente a la laguna de fermentación. Esto mismo se realizó para obtener un segundo litro.

De cada litro obtenido del cárcamo de recolección y del aparato de separación de sólidos y líquidos se tomaron 3 muestras de 2.5ml que se colocaron en viales de 4ml.

Para cada granja se realizaron dos repeticiones de acuerdo con el método descrito por Monteith y Shannon²⁸ (1986).

En el caso de los sólidos separados, se colectaron muestras de 500g en cinco lugares diferentes del depósito; a partir de estas se realizó una mezcla de la cual se obtuvieron 500g, esta se consideró la muestra de cada granja, la cual se transportó en bolsas de plástico y en refrigeración. De cada muestra de sólidos separados se tomaron 5g, que se colocaron en viales de 4 ml con medio de cultivo celular sin suero.

Todos los viales se mantuvieron en nitrógeno líquido hasta el momento de procesar las muestras por las pruebas de inmunofluorescencia directa, inmunoperoxidasa directa y ELISA de captura. El total de muestras se presenta en el Tabla 4.

Tabla 4. Cantidad de muestras por granja y total de las mismas.

No. granja	Cárcamo 1	Cárcamo 2	Separador 1	Separador 2	Sólidos	Total de muestras por granja
Granja 1	3	3	3	3	3	15
Granja 2	3	3	3	3	3	15
Granja 3	3	3	3	3	3	15
Granja 4	3	3	3	3	3	15
Granja 5	3	3	3	3	3	15
Granja 6	3	3	3	3	3	15
Granja 7	3	3	3	3	3	15
Granja 8	3	3	3	3	3	15
Granja 9	3	3	3	3	3	15
Granja 10	3	3	3	3	3	15
Total de muestras						150

Procedimiento experimental

Cada muestra se evaluó para detectar la presencia del vFPC por medio de las siguientes metodologías:

Recuperación del virus

Las muestras de heces se homogenizaron a partes iguales con medio de cultivo celular (MEM^a) sin suero fetal bovino (SFB^b). Previamente se prepararon botellas de plástico^c para cultivo celular de 25cm de crecimiento con células de riñón de cerdo (PK15). Las botellas se infectaron con las muestras homogenizadas y se dejaron incubar 60 minutos en la estufa para cultivo celular, posteriormente se congelaron. Veinticuatro horas después se

descongelaron y el contenido se decantó en tubos vacutainer los cuales se centrifugaron a 2800 rpm por 25 minutos, posteriormente las muestras fueron filtradas de manera estéril a través de membranas^d de 0.22µm.

Cultivo Celular

1. Se preparó una placa^e para cultivo celular de 96 pozos con células PK15, la cual se dejó incubar por 24 hrs.
2. Transcurridas las 24 horas se decantó el MEM con SFB y se depositaron 50µl de cada una de las muestras por cuadruplicado, las muestras fueron incubadas por 60 minutos en la estufa para cultivo celular a 37° C.
3. Una vez terminado el tiempo de incubación se decantó la placa y se adicionaron 200 µl de medio de cultivo sin SFB dejando incubar 48 hrs. a 37° C.
4. Al término de este tiempo se recolectó el sobrenadante de cada una de las muestras y se colocaron en tubos vacutainer estériles. Los sobrenadantes se mantuvieron en congelación hasta el momento de realizar la prueba de ELISA de captura.
6. Una vez hecho lo anterior, la placa se fijó con acetona al 30% por 10 minutos.

^aMinimum essential medium Sigma Aldrich Alemania Cat. M-0643

^bTerraCell Internacional Canadá Cat. CS-C08-500-U

^cBotellas de plástico Nunclon Dinamarca Cat. 163371

^dMembranas Sartorius Alemania Cat. 11107-25-N

^ePlacas para cultivo celular Nunclon Dinamarca Cat.163320

7. Se decantó la acetona y se secó la placa al aire, posteriormente se dejó por 3 hrs. en la estufa de cultivo celular para que se seque completamente.

Las placas de este modo preparadas se utilizaron en las pruebas de inmunofluorescencia directa e inmunoperoxidasa directa. Las placas que no se trabajaron el mismo día, se mantuvieron en congelación.

Inmunofluorescencia directa

Los pasos para realizar la prueba fueron los siguientes:

1. A la placa previamente fijada con acetona al 30% se le dió un lavado con 100µl con solución buferada de fosfatos (PBS) con Tween^f 80 al 0.05% por 5 minutos.
2. Se decantó y secó para eliminar el exceso de solución de lavado (SL).
3. Se agregaron 25µl del conjugado de isocianato de fluoresceína contra Pestivirus^g a una dilución 1:5 en cada pozo, se adicionaron 25µl de PBS y se dejó incubar 30 minutos a 37° C. El conjugado se diluyó en PBS.
4. Al terminar la incubación se le volvieron a dar 3 lavados de 150µl y al final se secó.
5. Se observó la placa en el microscopio de fluorescencia.

^fSigma Aldrich USA Cat. P-1754

^gBiotecnología Industrial Cat. 7610035

Inmunoperoxidasa directa

Los pasos para realizar la prueba fueron los siguientes:

1. La placa previamente fijada con acetona al 30%, al momento de ser utilizada se le realizó un lavado con 100µl con una SL que contenía: PBS y Tween 80 al 0.05% por 5 minutos, pasado este tiempo se decantó y se secó la placa para eliminar el exceso de SL.
2. Se agregaron 25µl por pozo de un antisuero policlonal^h contra FPC conjugado con peroxidasa contra el vFPC diluido en una solución de dilución (SD) que contenía: PBS, Tween 80 al 0.01% y suero de caballo al 5%, el conjugado se manejó a una dilución de 1:6 y se dejó incubar 60 minutos a 37° C.
3. Al terminar la incubación se le dieron 3 lavados de 100 µl por pozo con la SL, se decantó y secó.
6. Se adicionaron 50µl de sustrato e indicador y se dejó a temperatura ambiente por 15-20 minutos²⁹.

La preparación del sustrato e indicador fue según las especificaciones del producto de Ceditest (Ver anexo 2).

^hBiotecnología Industrial Cat. 7610030

ELISA de captura

Las muestras se manejaron de la siguiente manera, las que correspondían al cárcamo 1 de la Granja 1 se mezclaron, tomando la cantidad necesaria de cada una de las muestras para completar los 150µl que requería la prueba y se manejaron como una sola muestra. Lo mismo se realizó para el resto de las muestras de la Granja 1 y de las demás Granjas.

Los sobrenadantes se trabajaron a una dilución 3:4 y se analizaron mediante el kit comercial CHEKIT-CSF-Virus-II¹, para lo cual se siguió el procedimiento descrito por el fabricante³⁰ (Ver anexo 3).

Esta prueba maneja ciertos valores en porcentaje para determinar si una muestra es positiva, negativa o sospechosa. Los valores se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Valores para la prueba de ELISA de captura.

Valor %	Interpretación
< 30%	Negativo
30 – 40 %	Sospechoso
> 40%	Positivo

¹Laboratorio Bommeli Suiza

Análisis estadístico.

Se determinó el porcentaje de granjas positivas tanto para los sólidos, los líquidos y material del cárcamo de recolección. Para esto se utilizó una estadística de tipo descriptiva.

Resultados

No se les realizaron las pruebas a 28 muestras debido a que al momento de descongelar las muestras los criotubos que se utilizaron para la conservación no resistieron el cambio de temperatura y explotaron. Estas correspondían a las siguientes granjas: Granja 1: 3 muestra. Granja 2: 1 muestra. Granja 5: 3 muestras. Granja 7: 9 muestra. Granja 8: 12 muestras.

Imunoperoxidasa.

Al realizar el análisis de las muestras por medio de la prueba de inmunoperoxidasa, las 50 muestras del cárcamo, las 47 muestras provenientes del líquido obtenido del separador y las 25 muestras del sólido procesadas resultaron negativas a la presencia del virus. (Tablas 1, 2 y 3).

Tabla 6. Número de muestras del cárcamo que fueron analizadas por la prueba de inmunoperoxidasa.

	Número de muestras		Resultado	
	Cárcamo 1	Cárcamo 2	Positivo	Negativo
Granja 1	2	2	0	4
Granja 2	3	2	0	5
Granja 3	3	3	0	6
Granja 4	3	3	0	6
Granja 5	3	3	0	6
Granja 6	3	3	0	6
Granja 7	s/m	3	0	3
Granja 8	s/m	2	0	2
Granja 9	3	3	0	6
Granja 10	3	3	0	6
Total	23	27	0	50

s/m: Sin muestra

Tabla 7. Número de muestras del separador que fueron analizadas por la prueba de inmunoperoxidasa.

	Número de muestras		Resultado	
	Separador 1	Separador 2	Positivo	Negativo
Granja 1	2	3	0	5
Granja 2	3	3	0	6
Granja 3	3	3	0	6
Granja 4	3	3	0	6
Granja 5	2	1	0	3
Granja 6	3	3	0	6
Granja 7	3	s/m	0	3
Granja 8	s/m	s/m	s/m	s/m
Granja 9	3	3	0	6
Granja 10	3	3	0	6
Total	25	22	0	47

s/m: Sin muestra

Tabla 8. Número de muestras del sólido que fueron analizadas por la prueba de inmunoperoxidasa.

	Número de muestras	Resultado	
	Sólidos	Positivo	Negativo
Granja 1	3	0	3
Granja 2	3	0	3
Granja 3	3	0	3
Granja 4	3	0	3
Granja 5	3	0	3
Granja 6	3	0	3
Granja 7	s/m	s/m	s/m
Granja 8	1	0	1
Granja 9	3	0	3
Granja 10	3	0	3
Total	25	0	25

s/m: Sin muestra

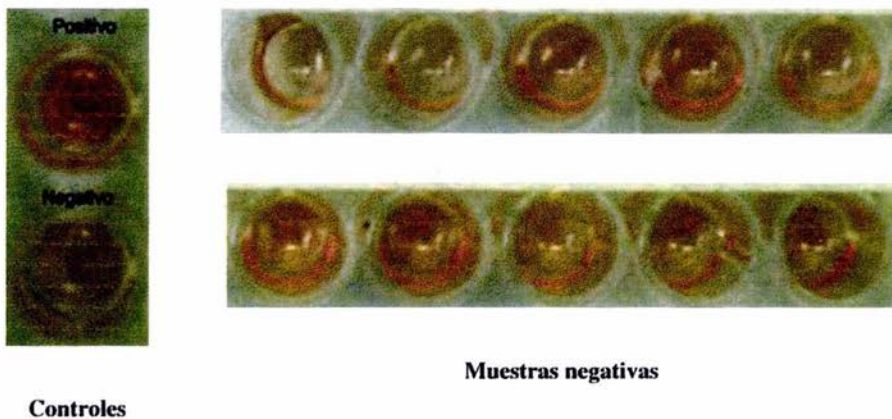


Figura 15. Del lado izquierdo en la parte superior se observa el control positivo y el negativo en la parte inferior. Del lado derecho se observan las muestras que resultaron negativas por la prueba de inmunoperoxidasa.

Inmunofluorescencia.

En 10 de las muestras que se analizarían por esta prueba no hubo la cantidad suficiente. Estas corresponden a las siguientes granjas: Granja 1: 1 muestra. Granja 2: 2 muestras. Granja 4: 1 muestra. Granja 5: 2 muestras. Granja 7: 1 muestra. Granja 9: 2 muestras. Granja 10: 1 muestra.

Al realizar el análisis de las muestras por medio de la prueba de inmunofluorescencia, las 42 muestras del cárcamo, las 45 muestras provenientes del líquido obtenido del separador y las 25 muestras del sólido procesadas resultaron negativas a la presencia del virus. (Tablas 4, 5 y 6).

Tabla 9. Número de muestras del cárcamo que fueron analizadas por la prueba de inmunofluorescencia.

	Número de muestras		Resultado	
	Cárcamo 1	Cárcamo 2	Positivo	Negativo
Granja 1	2	2	0	4
Granja 2	3	s/m	0	3
Granja 3	3	3	0	6
Granja 4	3	2	0	5
Granja 5	2	2	0	4
Granja 6	3	3	0	6
Granja 7	s/m	2	0	2
Granja 8	s/m	2	0	2
Granja 9	2	2	0	4
Granja 10	3	3	0	6
Total	21	21		42

s/m: Sin muestra

Tabla 10. Número de muestras del separador que fueron analizadas por la prueba de inmunofluorescencia.

	Número de muestras		Resultado	
	Separador 1	Separador 2	Positivo	Negativo
Granja 1	3	3	0	6
Granja 2	3	3	0	6
Granja 3	3	3	0	6
Granja 4	3	3	0	6
Granja 5	2	s/m	0	2
Granja 6	3	3	0	6
Granja 7	3	s/m	0	3
Granja 8	s/m	s/m	s/m	s/m
Granja 9	3	2	0	5
Granja 10	2	3	0	5
Total	25	20		45

s/m: Sin muestra

Tabla 11. Número de muestras del sólido que fueron analizadas por la prueba de inmunofluorescencia.

	Número de muestras Sólidos	Resultado	
		Positivo	Negativo
Granja 1	3	0	3
Granja 2	3	0	3
Granja 3	3	0	3
Granja 4	3	0	3
Granja 5	3	0	3
Granja 6	3	0	3
Granja 7	0	0	0
Granja 8	1	0	1
Granja 9	3	0	3
Granja 10	3	0	3
Total	25		25

s/m: Sin muestra

Prueba de ELISA de captura.

Al realizar la prueba de ELISA de captura, de las 18 muestras provenientes del cárcamo, 17 resultaron negativas (94.44%) y una muestra correspondiente a la Granja 1 resultó positiva a la presencia del virus de FPC (5.56%). El valor obtenido para esta muestra fue de 53.96039604% (Tabla 7).

Las 17 muestras provenientes del separador, resultaron negativas a la presencia del virus de FPC (100%) (Tabla 7).

De las 9 muestras de sólidos, 8 resultaron negativas (88.88%) y una muestra correspondiente a la Granja 1 resultó positiva a la presencia del virus de FPC (11.12%). El valor obtenido para esta muestra fue de 50.4950495%.(Tabla 7).

Los resultados obtenidos para todas las muestras analizadas se encuentran referidas en el Anexo 1.

Tabla 12. Presencia del vFPC a partir de muestras del cárcamo, separador y sólidos, utilizando la prueba de ELISA de captura.

	Cárcamo 1	Cárcamo 2	Separador 1	Separador 2	Sólidos
Granja 1	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)
Granja 2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Granja 3	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Granja 4	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Granja 5	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Granja 6	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Granja 7	s/m	(-)	(-)	s/m	s/m
Granja 8	s/m	(-)	s/m	s/m	(-)
Granja 9	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Granja 10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

s/m: Sin muestra, (-): negativo, (+): positivo

Discusión

Las muestras que resultaron positivas en la prueba de ELISA de captura pertenecen a una zona de Guanajuato donde solo se presentó un brote de FPC en el año de 2003.

Entre las causas por las cuales no se pudo detectar al virus por medio de inmunoperoxidasa e inmunofluorescencia se puede deber a ciertas propiedades viricidas del estiércol, entre ellas se encuentra la actividad bacteriana o proteolítica³¹.

La inactivación viral en excretas o mezcla de aguas residuales es causada por la actividad microbiana, en muchos casos, los niveles de algunos virus han sido reducidos por la adición de proteasas, demostrando que la actividad proteolítica es en parte responsable de este efecto³¹.

Otro componente viricida que tiene el estiércol es el amoníaco. Usualmente el estiércol de cerdo tiene un pH alcalino de entre 7.5 a 8. Bajo estas condiciones, una porción pequeña de amoníaco está presente en forma de moléculas no ionizadas (NH_3), las cuales se sabe tienen propiedades viricidas. Este efecto se demostró por la acidificación del estiércol a un pH de 6.5, en el cual los iones de amoníaco predominan. Al incrementar la temperatura, aumenta la producción de amoníaco siendo este el responsable de la inactivación. Esta actividad también se ve influenciada por el pH, para lo cual este debe ser mayor a 8 y con esto el amoníaco pueda tener un efecto viricida³¹.

Otra de la causa por la cual el virus no puede ser aislado puede ser debido a que estos son adsorbidos o se adhieren a las partículas de estiércol y por esta causa removidos con el material sedimentado al momento de la centrifugación¹.

También se ha observado que el número de patógenos es reducido durante el tratamiento aerobio del estiércol³¹.

El encontrar muestras positivas con la técnica de ELISA de captura y no con las técnicas inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa se puede deber a que la técnica de ELISA es más sensible y específica para la detección del vFPC, ya que los anticuerpos que utiliza son específicos contra la glicoproteína gp44/48 que se encuentra presente en este virus. Esta técnica utiliza placas que se encuentran cubiertas con anticuerpos específicos contra la glicoproteína E0, la cual es un glicoproteína de envoltura (gp44/48). Si la glicoproteína se encuentra presente en la muestra habrá una unión específica con los anticuerpos anti-glicoproteína que se encuentran fijados en los pozos de la placa, y para evidenciar esta reacción se utiliza un conjugado anti-glicoproteína marcado con peroxidasa.

Las muestras que resultaron positivas por la prueba de ELISA de captura pertenecen a una granja en la cual se estaba vacunando. Se ha mencionado que la vacunación no proporciona una protección absoluta e incluso permite que el virus se establezca de manera endémica en la piara infectada³².

La vacunación solo aumenta el umbral de infección de los cerdos, pero no impide la infección, y cuando ocurre, sólo reduce las manifestaciones clínicas, la excreción de virus y la mortalidad. Es por este motivo que el virus puede entrar a una piara vacunada y se puede difundir a través del manejo de los animales o sus desechos³².

En un estudio realizado por Lozada³², se encontró una eficacia de la vacuna de un 64% y en otro de 36%, sin poder determinar a que se debió la menor potencia de la vacuna cuando se aplicaba a nivel de campo. Una posibilidad es que se hayan vacunado animales que tenían

todavía anticuerpos maternos o que los animales estaban infectados con el virus que causa el Síndrome Respiratorio y Reproductivo del Cerdo (PRRS), el síndrome del Ojo Azul (SOA) o existía algún otro factor inmunosupresor que impidió que se desarrollara una respuesta inmune adecuada, tal y como se observó en la Granja 1, donde el Médico Veterinario encargado mencionó que se habían presentado brotes de PRRS y SOA en el área de servicios y gestación.

En ese mismo estudio se realizó una encuesta serológica donde se pudo determinar que en algunas de las granjas que no estaban vacunando y consideradas como negativas clínicamente a FPC había animales seropositivos, lo que sugería que el virus de campo se encontraba de manera endémica³².

Cuando se presenta un brote en una granja intensiva, un inconveniente aparte de los costos por concepto de mortalidad son las grandes cantidades de estiércol que puede estar contaminado. Este no puede ser manejado en la forma usual, es decir, para fertilizar tierras de cultivo o utilizarlo como alimento para los mismos animales, debido a que algunos virus pueden permanecer viables por largos periodos de tiempo en el estiércol dependiendo de las condiciones de almacenamiento y su disposición; lo anterior es un riesgo de diseminación del virus en la misma granja o en granjas contiguas^{33,34}.

Los niveles de virus presentes en el estiércol después de un brote para el caso de Fiebre Aftosa y la Enfermedad de Aujeszky son bajos, tal vez 10^{-2} - 10^{-3} esto debido a que no son enfermedades hemorrágicas y las excretas de los animales enfermos no contienen grandes cantidades de sangre. En el caso de enfermedades hemorrágicas como la Fiebre Porcina Africana se puede presentar un título de 10^{-9} TCID₅₀ ml⁻¹ en sangre. La Fiebre Porcina

Clásica es también una enfermedad hemorrágica por lo que hay presencia de sangre en las heces, y si bien esta no excede el 1% del volumen total del estiércol, pueden contener una media de 10^7 TCID₅₀ ml⁻¹. No hay datos disponibles que mencionen los niveles requeridos para infectar a los cerdos a partir de estiércol contaminado^{34, 35}.

En otro estudio en el cual se inocularon cerdos con el vFPC vía intranasal e intramuscular, permanecieron en las instalaciones por 8 días, al término de este tiempo fueron sacados de los corrales y sacrificados, 24 horas después se colocaron nuevos animales susceptibles a ser infectados, estos se dejaron por 35 días, al término de este tiempo estos animales fueron sacrificados. De todos los animales se tomaron muestras de tejido, sangre, heces e hisopos con exudado nasal. Dos muestras de heces fueron colectadas de los corrales al momento de sacar a los primeros animales y al momento de introducir a los segundos. De los animales infectados, todas las muestras de tejido fueron positivas y 4 muestras de exudado nasal resultaron positivas. En un solo cerdo el virus pudo ser aislado a partir de heces colectadas de manera directa del colon con un título de 10^1 . De las excretas colectadas de los corrales al momento de despoblar y repoblar, el virus no pudo ser aislado. De los animales que se utilizaron para repoblar los corrales, la sangre fue negativa al aislamiento viral y a prueba de RT-PCR, no se detectaron anticuerpos y las muestras de tejido fueron negativas. Esto indica que el periodo de incubación fue muy corto para que el virus pudiera eliminarse por las excreciones³⁶.

Esto concuerda con los resultados obtenidos por Depner *et al*³⁵ donde encontró que el vFPC puede ser aislado de fluidos nasales y heces entre los 10 y 14 días post inoculación³⁷.

Actualmente se considera que en las zonas porcícolas del altiplano, el vFPC se encuentra de manera endémica en algunas piaras comerciales y de explotaciones de traspatio.³²

El hecho de haber encontrado muestras positivas al vFPC no quiere decir que el virus estuviera viable. La prueba de ELISA de captura detecta la glicoproteína E0 del virus y estas pueden ser proteínas de membrana procedentes de virus destruidos por lo diferentes procesos de inactivación que se llevan a cabo en el estiércol. En el caso de solo existir proteínas virales las pruebas de inmunoperoxidasa e inmunofluorescencia resultan negativas, ya que estas necesitan de la replicación del virus en el citoplasma de las células para que este sea detectado.

Conclusiones

El virus de Fiebre Porcina Clásica puede ser aislado a partir excretas porcinas sólidas y de muestras del cárcamo, esto no indica que el virus es viable o que la cantidad de virus sea suficiente para infectar a los cerdos.

La prueba de ELISA de captura resultó tener más sensibilidad para detectar el virus de Fiebre Porcina Clásica, debido a su capacidad para detectar proteínas específicas del virus, en este caso la glicoproteína E0.

Las pruebas de inmunoperoxidasa directa e inmunofluorescencia directa no fueron capaces de detectar al virus, lo que no quiere decir que el virus no estuviera presente.

Se recomienda dar algún tratamiento a las excretas sólidas y líquidas para eliminar o disminuir la presencia del virus.

Literatura citada

- 1 Haas R. Inactivation of viruses in liquid manure. Review Science Technology. OIE. 1995;14:435-445.
- 2 NOM-001-ECOL-1996. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca y aprobada por la Comisión Nacional del Agua
- 3 Alvarez S.P.C.; Gutiérrez V.E. Engorda de toretes a base de estiércol fresco de cerdo y de fuentes de fibra en una empresa comercial. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH) Morelia Michoacán, México, 2001
- 4 Iñiguez G. Aprovechamiento del estiércol de cerdo mediante fermentación. Nuestro Acontecer Porcino. 1993;1:14-20.
- 5 Strauch G, Ballarini G. Hygienic aspects of the production and agricultural use of animal wastes. J. Vet. Med. 1994;41:176-228.
- 6 Mengeling L, Paul PS. Interepizootic survival of porcine parvoviruses. Journal of American Veterinary Medical Association. 188 1986;11:1293-1295
- 7 Martínez GRG. Evaluación microbiológica de ensilados a base de excretas porcinas. (tesis de maestría).México (D.F.) México : FMVZ-UNAM,.1999.
- 8 Dore RAP, Stefanelli CC, Carvalho LRE, Guimaraes de Brito B, Vera GNS, Cassia LR, Nozawa C. The stability of porcine rotavirus in feces. Veterinary Microbiology 2000;71:1-8.

9 Derbyshire J.B. Adenovirus. Diseases of Swine 8th Edition. Edited by Leman, A.D. *et al.*, Iowa State University: 1999:89.

10 Van Oirschot J.T. Enterovirus. Diseases of Swine 8th Edition. Edited by Leman, A.D. *et al.*, Iowa State University:1999:159-172

11 Luckert PD, Allan GM. Porcine Circovirus. Diseases of Swine 8th Edition. Edited by Leman, A.D. *et al.*, Iowa State University. 1999.

12 Pensaert MB. Porcine Epidemic Diarrhea. Diseases of Swine 8th Edition. Edited by Leman, A.D. *et al.*, Iowa State University. 1999.

13 Botner A. (1990) Modelstudier vedrorende overlevelse of virus i gylle under traditionel opbevaring og under udradningi biogasanlaeg. Research report. State Veterinary Institute for Virus Research, Lindholm. Denmark. 74 pp.

14 Van Oirschot JT. Classical Swine Fever (Hog Cholera). Diseases of Swine 8th Edition. Edited by Leman, A.D. *et al.*, Iowa State University. 1999.

15 Edwards S. Survival and inactivation of classical swine fever virus. *Veterinary Microbiology* 2000; 73:175-181.

16 Edwards S, Fukusho A, Lefevre Pierre-Charles, Lipowski A, Pejsak Z, Roeche P. and Westergaard J. Classical swine fever: the global situation. *Veterinary Microbiology*. 2000; 73:103-119.

17 <http://www.sagarpa.gob.mx/Conasag/fpc.htm>

18 Sadoka Y, Yamaguchi O, Fukusho A. A new assay for classical swine fever virus based on cytopathogenicity in porcine kidney cell line FS-L3. *Journal of Virological Methods* 1998; 70:93-101.

19 <http://www.sanidadanimal.info/inmuno/TERCERO1.HTM> Dr. J.M. Sánchez-Vizcaino Rodríguez

20 Liess B. (1987) *Classical swine fever and related viral infections*. Martinus Nijhoff Publishing pp. 46

21 http://www.vet.uga.edu/vpp/gray_book/Images/065.htm Gilles C. Dulac, D.V.M., M.Sc., Ph.D. Animal Diseases Research Institute, Nepean, Ontario, Canada

22 Moennig V., Floegel-niesmann G. y Greiser-Wilke I. Clinical signs and epidemiology of classical swine fever: A review of new knowledge. *The Veterinary Journal*, 2003, 165, 11-20.

23 http://www.vet.uga.edu/vpp/gray_book/Images/069.htm Gilles C. Dulac, D.V.M., M.Sc., Ph.D. Animal Diseases Research Institute, Nepean, Ontario, Canada

24 http://www.vet.uga.edu/vpp/gray_book/Images/068.htm Gilles C. Dulac, D.V.M., M.Sc., Ph.D. Animal Diseases Research Institute, Nepean, Ontario, Canada

25 http://www.vet.uga.edu/vpp/gray_book/Images/066.htm Gilles C. Dulac, D.V.M., M.Sc., Ph.D. Animal Diseases Research Institute, Nepean, Ontario, Canada

26 Moennig V. Introduction to classical swine fever: virus, disease and control policy. *Veterinary Microbiology* 2000; 73:93-102.

27 <http://www.ipasa.com.mx/separador11.html>

28 Monteith, H. D. and Shannon, E. E. (1986). The inactivation of a bovine enterovirus and a bovine parvovirus in cattle manure by anaerobic digestion, heat treatment, gamma irradiation, ensilage and composting. *J. HYG. CAMB.* 97:175-184

29 Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines 2000 4th edition
http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/E_00015.htm

30 Manual Chekit CSF-Virus-II, Laboratorios Bomelli, Suiza.

31 Turner C, Burton HC. The inactivation of viruses in pig slurries: a review. *Bioresource Technology* 1997; 61:9-20.

32 Lozada G. A. Estudio epidemiológico de la fiebre porcina clásica en granjas del altiplano de México. *Técnica Pecuaria México* 2003; 41(3):261-274

33 Turner C.; Williams S.M.; Wilkinson P.J. Recovery and assay of African swine fever and swine vesicular disease viruses from pig slurry. *Journal of Applied Microbiology* 1999; vol. 87, no.3, pp. 447-453

34 Turner C.; Williams S.M.; Cumby T.R. The inactivation of foot and mouth disease, Aujeszky's disease and classical swine fever viruses in pig slurry. *Journal of Applied Microbiology* 2000; vol. 89, pp. 760-767

35 McVicar J. Quantitative aspects of the transmission of African swine fever. *American Journal of Veterinary Research*; 1984, 45(8), 1535-1541

36 Dewulf J., Laevens H., Koenen F., Mintiens K. y Kruif de A. Can classical swine fever be transmitted by excretions of infected pig?, Proceedings of the 17th IPVS Congress, Ames, Iowa, USA, 2002, vol. 1 pp. 153

37 Depner K et al Winer Tierärztliche Monatschrift 1994; vol.81, pp. 370-373

ANEXO 1

Resultados de la prueba de ELISA de captura.

	Identificación	Interpretación	Resultado		Identificación	Interpretación	Resultado
Granja 1	1	-26.73	(-)	Granja 6	1	-24.25	(-)
	2	53.96	(+)		2	-2.97	(-)
	3	-19.80	(-)		3	-14.85	(-)
	4	-12.87	(-)		4	-30.69	(-)
	5	50.49	(+)		5	-17.82	(-)
Granja 2	1	-28.21	(-)	Granja 7	1	s/m	s/m
	2	-2.47	(-)		2	-27.72	(-)
	3	-11.88	(-)		3	13.36	(-)
	4	-20.79	(-)		4	s/m	s/m
	5	-6.43	(-)		5	s/m	s/m
Granja 3	1	-18.81	(-)	Granja 8	1	s/m	s/m
	2	-22.27	(-)		2	-15.84	(-)
	3	-10.39	(-)		3	s/m	s/m
	4	-22.27	(-)		4	s/m	s/m
	5	-29.70	(-)		5	-18.81	(-)
Granja 4	1	-24.75	(-)	Granja 9	1	-20.29	(-)
	2	-21.28	(-)		2	-22.27	(-)
	3	-13.36	(-)		3	-23.76	(-)
	4	-12.87	(-)		4	-22.77	(-)
	5	-8.41	(-)		5	-10.39	(-)
Granja 5	1	-7.92	(-)	Granja 10	1	-22.27	(-)
	2	-20.29	(-)		2	-22.77	(-)
	3	-15.34	(-)		3	-19.80	(-)
	4	-25.24	(-)		4	-28.71	(-)
	5	-11.88	(-)		5	-21.281	(-)

1: Cárcamo 1, 2: Cárcamo 2, 3: Separador 1, 4: Separador 2, 5: Sólidos, s/m: sin muestra.

ANEXO 2

Reactivos necesarios para la preparación del sustrato e indicador para la prueba de inmunoperoxidasa.

Solución A: 0.4% de 3 amino 9 etilcarbazol en 1 ml de N, N-dimetilformamida (4mg por 1 ml)³².

Solución B: 0.05M de acetato de sodio con un pH 5³².

Solución C: Solución de peroxido de hidrógeno al 30%.³²

La solución final se preparó de la siguiente manera:

1ml de la solución A + 19ml de la solución B + 10 μ l de la solución C³².

ANEXO 3

Instrucciones para la realización de la prueba de ELISA de captura del kit comercial CSF-VIRUS-II del Laboratorio Bommeli .

- 1.- Determinar la cantidad de solución de lavado para lavar las placas Ejemplo: 10 ml de solución concentrada al 10x y 90 ml de agua destilada.
- 2.- Determinar la cantidad de solución diluyente para las muestras, controles y conjugado. Ejemplo: 1 parte de la solución A, 1 parte de solución B y 3 partes de agua destilada.
- 3.- Depositar 50 µl de la solución diluyente en los pozos correspondientes.
- 4.- Depositar 150 µl de las muestras y controles sin diluir, homogeneizar. La dilución final de las muestras y controles es de 3:4.
- 5.- Dejar incubar 60 minutos a 37° C en una cámara húmeda.
- 6.- Realizar 3 lavados de 300 µl, decantar y secar.
- 7.- Adicionar 200 µl por pozo del conjugado diluido 1:200 utilizando el diluyente de muestras y conjugado.
- 8.- Dejar incubar 60 minutos a 37° C en una cámara húmeda.
- 9.- Repetir el paso 6.
- 10.- Adicionar 200 µl del cromógeno en cada pozo.
- 11.- Realizar la lectura de la placa en un fotómetro en un longitud de onda de 405nm.

