

01674



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL

EFEECTO DE LA VACUNA DE FIEBRE PORCINA CLÁSICA (PAV 250)
Y LA INOCULACIÓN DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DEL OJO AZUL
EN CERDOS PELÓN MEXICANO.

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS
P R E S E N T A
MARÍA MARTHA SOTO MENDOZA

Matrícula: 338778

TUTOR: HUMBERTO RAMÍREZ MENDOZA
CÓMITE TUTORAL

EDGAR ZENTENO GALINDO
FERNANDO DÍAZ OTERO



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el
contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: María Martha Soto
Mendoza

FECHA: 16 Nov - 2009

FIRMA: [Signature]

DEDICATORIAS

Este trabajo de investigación lo dedico con gran cariño

A mi esposo, porque esto es parte de nuestro proyecto de vida, gracias por creer en mi.

TE AMO

A mis padres, quienes me han dado el mejor regalo, mi vida.

Los amo.

A mis hermanos, sus experiencias y consejos me han enseñado a vivir. Gracias por el apoyo , los quiero.

A mis amigos, quienes me permiten ser y compartir parte de nuestras vidas.

A mi familia, por aceptarme en sus vidas y creer en mi.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó gracias al apoyo de muchos amigos y compañeros.

A Jesús gracias por brindarme tu apoyo incondicional, pero sobre todo tu amor.

Agradezco al Dr. Humberto Ramírez M, el haberme brindado confianza, apoyo, enseñanza y su valiosa amistad desde el primer momento.

Agradezco al Dr. Danilo Méndez M. por el apoyo, colaboración, y confianza en todo momento bajo la consigna de superarme.

A los jefes del Departamento de producción Animal: Cerdos, Dra. Ma. Elena Trujillo y Dr. Marco Antonio Herradora, por permitirme realizar parte del proyecto en las instalaciones a su cargo.

A Jonathan Garfias por su tiempo y conocimientos.

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias por permitirme trabajar en sus instalaciones.

A la Dra. Andrea Rodríguez Ropón quien me ofreció enseñanza paciente y precisa; además de su sincera amistad y apoyo.

A los miembros del departamento de inmunología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN por permitirme trabajar con ellos en sus instalaciones.

Al MVZ Mario Solís por el apoyo en las pruebas de laboratorio.

Al MVZ Carlos Cedillo por el apoyo brindado y su amistad

Al Dr. Héctor Castillo por el trabajo realizado en la parte estadística de este proyecto.

Agradezco al Dr. Pedro Pradal Roa su amable colaboración en este proyecto.

Al Dr. Jorge López Morales por sus atinados consejos.

Dr. Pablo Correa, Dr. Fernando Díaz Otero, Dr. Julio Reyes Leyva y Dr. Edgar Zenteno, gracias por el tiempo que dedicaron a la revisión de este trabajo y sus comentarios para mejorarlo.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y tecnología de quienes obtuve apoyo económico durante el proyecto.

A la Universidad Nacional Autónoma de México a través de sus Facultades e institutos.

A todas y cada una de aquellas personas que escaparon de mi mente al momento de realizar este escrito, GRACIAS.

RECONOCIMIENTO INSTITUCIONALES

Este proyecto de investigación se realizó en las siguientes instituciones

Departamento de Producción Animal: Cerdos, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México, D.F.

Departamento de Investigación en Bioquímica, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), Secretaría de Salud, Tlalpan, México D.F.

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México D.F.

Este Proyecto contó con el apoyo de:

Proyecto PAPIIT – IN226598
Proyecto CONACYT 27693-B

La autora de este trabajo fue becaria del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

RESUMEN

Uno de los factores que limitan el desarrollo de la porcicultura nacional, incluida la rural, es la presencia de enfermedades. Es el caso de la Fiebre Porcina Clásica (FPC) y de la enfermedad de ojo azul también enzootico en México. El objetivo de este trabajo fue evaluar las subpoblaciones de los linfocitos $CD4^+ CD8^-$, $CD4^- CD8^+$, $CD4^+ CD8^+$, $CD4^- CD8^-$, en cerdos sanos Pelón Mexicano y el efecto de la vacunación contra la FPC-PAV-250 y el virus de la enfermedad del ojo azul. El estudio se dividió en dos etapas en la primera, se logró cuantificar las cuatro subpoblaciones. En la segunda, doce cerdos Pelón Mexicano de dos meses de edad fueron divididos en cuatro grupos. El primero fue vacunado contra la FPC-PAV-250. El segundo fue vacunado con la vacuna contra la FPC-PAV 250 y tres días después fue inoculado vía oronasal, con el virus de la enfermedad del ojo azul (VEOA). El tercero sólo se inoculó con VEOA. El cuarto sirvió como testigo. El análisis de las subpoblaciones linfocitarias y de la respuesta celular se hizo por citometría de flujo. Los resultados de la primera etapa mostraron que la subpoblación $CD4^- CD8^+$ resultó con valores superiores, para esa edad, a los reportados en la literatura para cerdos los convencionales. En la segunda etapa se evaluaron las temperaturas rectales, signos clínicos y la respuesta inmune humoral. No se observaron signos clínicos en ninguno de los tratamientos. La temperatura sólo se incrementó a las 24 y 48 horas en los grupos que se inocularon con el VEOA. Los valores de las biometrías hemáticas no tuvieron ningún cambio significativo ($p < 0.05$). La respuesta humoral en los animales con doble tratamiento fue más tardía con respecto a los otros grupos. En los animales de los grupos dos y tres se encontró un descenso en los linfocitos $CD4^+ CD8^-$ ($p < 0.05$) a partir de la primer semana. Los linfocitos $CD4^- CD8^+$ aumentaron ($p < 0.05$) desde la primer semana en los animales del Grupo 1 y 3. Los resultados demuestran que las alteraciones en las subpoblaciones linfocitarias en cerdos Pelón Mexicano inoculado con *Rubulavirus porcino* son iguales a las observadas por otros autores en cerdos convencionales. Que la respuesta celular en los cerdos del Grupo 2 responde a un efecto del virus de ojo azul y no de la vacuna. La vacuna PAV 250 generó incremento en las subpoblación $CD4^- CD8^+$ y $CD4^- CD8^-$.

Palabras claves: Cerdo Pelón Mexicano, subpoblaciones linfocitarias, fiebre porcina clásica, vacuna PAV 250, enfermedad del ojo azul.

ABSTRACT

One of the factors that determine the national development of the pig production including the rural one is the presence of diseases. It is the case of the Classical Swine Fever (CSF) and of Blue Eye Disease (BED) both enzootic in México. The aim of this study were to evaluate the sub-populations of lymphocytes $CD4^+ CD8^-$, $CD4^-CD8^+$, $CD4^+CD8^+$, $CD4^-CD8^-$, in healthy Mexican hairless pigs and the effect of vaccinations against CSF (PAV-250 strain) and the oral inoculation of the BED virus. This study was divided in two stages; in the first one we were able to demonstrate and to quantify the four lymphocytes sub-populations. For the second stage twelve 2 months old Mexican hairless pigs were divided in to four groups. The First group was vaccinated with CSF PAV-250. The second group was vaccinated again CSF (PAV 250) and three days later they were intranasally inoculated with the virus of the blue eye disease (BEDV). The third group was only inoculated with the BEDV. The fourth group served as a control. The lymphocyte subpopulations and the cellular immune response was measured through a become flow cytometric analysis. The results of the first stage showed that subpopulation $CD4^-CD8^+$ were higher for that age to the values reported previously in literature for conventional pigs. In the second stage body temperatures, clinical signs, humoral and cellular immune response were evaluated. In all four experimental groups, no clinical signs were observed. The body temperature showed an increase after 24 and 48 hours post inoculation in the groups with BEDV. The haematic values of biometry did not have any statistical significance ($p < 0.05$). The humoral response in the animals with double treatment was more delayed with respect to the other groups. From the first weak of the study there was a depletion of lymphocytes $CD4^+CD8^-$ ($p < 0.05$) in the animal of groups 2 and 3. Lymphocytes $CD4^-CD8^+$ increased ($p < 0.05$) from the first week in the animals of group 1 and 3. The results showed that the alterations in sub-populations of lymphocytes in Mexican hairless pigs challenged with BEDV are similar to those observed by other authors in conventional pigs. That the cell immune response in the pigs of group 2 responds to an effect of the BEDV and not of the CSF vaccine. PAV 250 Vaccine generates increase in sub-populations $CD4^-CD8^+$ and $CD4^-CD8^-$.

Key words: Mexican hairless pigs, lymphocytes sub-populations, Classical Swine Fever, PAV 250, BED, BEDV.

CONTENIDO

1.	RESUMEN	
2.	INTRODUCCIÓN	
2.1.	Antecedentes	1
2.1.1	Cerdo Pelón Mexicano	1
2.1.2	Fiebre Porcina Clásica	3
2.1.3	Enfermedad del Ojo Azul	6
2.1.4	Respuesta inmune del cerdo	9
2.1.5	Características de los linfocitos porcinos	10
2.1.6	Aspectos generales de la inmunidad frente a los virus	11
2.2.	Justificación	12
2.3.	Hipótesis	12
2.4.	Objetivo general	12
2.5.	Objetivos específicos	12
3.	MATERIAL Y MÉTODOS	
3.1.	ETAPA I	14
3.1.1.	Animales	14
3.1.2.	Diseño experimental	14
3.1.3.	Separación de células mononucleares	14
3.1.4.	Identificación de subpoblaciones de los linfocitos	15
3.2.	ETAPA II	15
3.2.1.	Animales	15
3.2.2.	Diseño experimental	16
3.2.3.	Instalaciones	17
3.2.4.	Virus	17
3.2.5.	Vacuna	18
3.2.6.	Obtención de las muestras de sangre	19
3.2.7.	Biometrías hemáticas	19
3.2.8.	Respuesta humoral	19
3.2.9.	Aislamiento viral	20
3.2.10.	Separación de células mononucleares	22
3.2.11.	Identificación de subpoblaciones de linfocitos	22
3.2.12.	Análisis estadístico de resultados	22

4.	RESULTADOS	
4.1	ETAPA I	
4.1.1.	Identificación y cuantificación de subpoblaciones de linfocitos	25
4.2.	ETAPA II	
4.2.1.	Título del virus	26
4.2.2.	Signos clínicos	26
4.2.3.	Temperaturas rectales	27
4.2.4.	Biometrías hemáticas	28
4.2.5.	Respuesta humoral	30
4.2.6.	Detección de antígenos virales	32
4.2.7.	Subpoblaciones de los linfocitos en sangre periférica	33
5.	DISCUSIÓN	
5.1.	Etapa I	35
5.2.	Etapa II	36
6.	CONCLUSIONES	45
7.	REFERENCIAS	47
8.	ANEXO	54

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Título	Página
Cuadro 1	Promedio de células mononucleares en la sangre periférica de cerdos Pelón Mexicano sanos.	24
Cuadro 2	Temperatura rectal de cerdos Pelón Mexicano durante la fase experimental.	26
Cuadro 3	Promedio de leucocitos ($10^9/L$)+/- SD) en la sangre periférica de cerdos Pelón Mexicano durante la fase experimental	28
Cuadro 4	Promedio de los linfocitos ($10^9/L$)+/- SD) en la sangre periférica de cerdos Pelón Mexicano postvacunación.	39
Cuadro 5	Títulos de anticuerpos contra el virus de la enfermedad del ojo azul, detectados por la técnica de inhibición de la hemoaglutinación, en cerdos Pelón Mexicano durante la fase de experimentación.	30
Cuadro 6	Animales positivos a la presencia de anticuerpos contra el virus de la FPC detectados por la técnica de ELISA, durante la fase experimental..	31
Cuadro 7	Análisis de varianza de leucocitos durante la fase experimental en los cuatro grupos.	54
Cuadro 8	Análisis de varianza de los linfocitos durante la fase experimental en los cuatro grupos.	54
Cuadro 9	Análisis de varianza de los linfocitos sanguíneos $CD4^+CD8^-$, evaluando los cuatro grupos de cerdos	55
Cuadro 10	Análisis de varianza de los linfocitos sanguíneos $CD4^-CD8^+$, evaluando los cuatro grupos de cerdos	55
Cuadro 11	Análisis de varianza de los linfocitos sanguíneos $CD4+CD8^+$, evaluando los cuatro grupos de cerdos	56
Cuadro 12	Análisis de varianza de los linfocitos sanguíneos $CD4^-CD8^-$, evaluando los cuatro grupos de cerdos	56

Cuadro 13	Análisis de varianza de los linfocitos CD4 ⁻ CD8 ⁺ en cerdos Pelón Mexicano vacunados con la vacuna PAV-250 contra la FPC	57
Cuadro 14	Análisis de varianza de los linfocitos CD4 ⁻ CD8 ⁻ en cerdos Pelón Mexicano vacunados con la vacuna PAV-250 contra la FPC.	57
Cuadro 15	Análisis de varianza de los linfocitos CD4 ⁺ CD8 ⁻ en cerdos Pelón Mexicano, vacunados con la vacuna PAV-250 contra la FPC e inoculados con el <i>Rubulavirus porcino</i> .	58
Cuadro 16	Análisis de varianza de los linfocitos CD4 ⁺ CD8 ⁻ en cerdos Pelón Mexicano, inoculados con el <i>Rubulavirus porcino</i> .	58
Cuadro 17	Análisis de varianza de los linfocitos CD4 ⁻ CD8 ⁺ en cerdos Pelón Mexicano inoculados con el <i>Rubulavirus porcino</i>	59
Cuadro 18	Biometrías hemáticas de los cerdos vacunados con FPC. (Grupo 1).	60
Cuadro 19	Biometrías hemáticas de los cerdos vacunados con la vacuna PAV-250 contra la FPC e inoculados con el virus de la enfermedad del ojo azul . (Grupo 2).	51
Cuadro 20	Biometrías hemáticas de los cerdos inoculados con el virus de la enfermedad del ojo azul. (Grupo 3).	62
Cuadro 21	Biometrías hemáticas de los cerdos testigo. (Grupo 4).	63
Cuadro 22	Estadística descriptiva de las variables en estudio, evaluando los cuatro grupos de cerdos Pelón Mexicano.	64
Cuadro 23	Estadística descriptiva de las variables en estudio, evaluando a los animales vacunados con la vacuna PAV 250.	64
Cuadro 24	Estadística descriptiva de las variables en estudio evaluando a los animales vacunados con la vacuna PAV 250, e inoculados con el virus de la enfermedad del ojo azul.	64

Cuadro 25	Estadística descriptiva de las variables en estudio, evaluando a los animales inoculados con el virus de la enfermedad de ojo azul.	65
Cuadro 26	Estadística descriptiva de las variables en estudio, evaluando a los animales testigo.	65

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Página
Figura 1	Diagramas de subpoblaciones linfocitarias en la sangre periférica de cerdos sanos Pelón Mexicano, en el citómetro de flujo.	25
Figura 2	Porcentaje de subpoblaciones linfocitarias en la sangre periférica de cerdos Pelón Mexicano sanos.	66
Figura 3	Temperatura rectal de los cerdos durante la fase experimental	66
Figura 4	Cuentas de leucocitos de cerdos durante la fase experimental	67
Figura 5	Cuentas de linfocitos de cerdos durante la fase experimental	67
Figura 6	Títulos de anticuerpos contra el <i>Rubulavirus porcino</i> en cerdos inoculados con este virus. (Grupo 3)	68
Figura 7	Títulos de anticuerpos contra el <i>Rubulavirus porcino</i> en cerdos inoculados con este virus y vacunados con PAV-250. (Grupo 2)	68
Figura 8	Comportamiento de los linfocitos sanguíneos CD4 ⁺ CD8 ⁻ en cerdos Pelón Mexicano vacunados con PAV 250 e inoculados el <i>Rubulavirus porcino</i>	69
Figura 9	Comportamiento de los linfocitos sanguíneos CD4 ⁻ CD8 ⁺ en cerdos Pelón Mexicano, vacunados con la PAV-250 e inoculados con el <i>Rubulavirus porcino</i>	69
Figura 10	Comportamiento de los linfocitos sanguíneos CD4 ⁻ CD8 ⁻ en cerdos Pelón Mexicano, vacunados con la PAV-250 e inoculados con el <i>Rubulavirus porcino</i> .	70
Figura 11	Comportamiento de los linfocitos sanguíneos CD4 ⁺ CD8 ⁺ en cerdos Pelón Mexicano, vacunados con PAV-250 e inoculados con el <i>Rubulavirus porcino</i>	70

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Antecedentes

La porcicultura en México es una actividad que históricamente ha sido arraigada a las zonas rurales, constituyendo por un lado una fuente de ingreso y por otro un excelente fuente de alimentación. Los cambios en la porcicultura mexicana en los últimos 25 años han transformado básicamente al pequeño y mediano productor, en un productor empresarial, dependiente de las industrias productoras de alimento. Los cambios también han llegado en los aspectos genéticos, transformándose paulatinamente las razas autóctonas por las llamadas razas modernas.¹

En México, no existía el cerdo antes de la llegada de Colón a tierras americanas; fueron los conquistadores españoles los que lo trajeron a América, estando actualmente generalizada su crianza y reproducción en el continente.

Fueron cuatro las razas porcinas colonizadoras: Céltica, Ibérica, Napolitana y Asiática, la falta de un control entre ellas propició su cruzamiento, teniendo como consecuencia la creación de un biotipo, diferente: al cerdo Pelón Mexicano (*Sus scrufa domesticus*). Actualmente el cerdo Pelón Mexicano se localizan en Veracruz, Puebla, Tabasco, Campeche y Yucatán. En el Pacífico se les encuentra en los estados de Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Chiapas; a principios del siglo constituían el 95% de los inventarios porcícolas, en la década de los sesentas la población sólo ascendía a dos millones de cerdos que representaban menos de un 30% del total de cerdos de México.²

2.1.1. Cerdo Pelón Mexicano

La característica principal del cerdo Pelón Mexicano, es la falta de cerdas en toda la superficie de la piel, presentando un color gris pizarra o negro total

con arrugas en la región maxilar, abdominal y del cuello, por su color de piel no se observan casos de fotosensibilidad o eritema solar como en las razas de color blanco.^{2,3} Son animales de gran rusticidad, adaptados a las condiciones del medio ambiente en el que viven. Por tales características son explotados en las comunidades rurales en forma poco tecnificada; consumen gran cantidad de plantas forrajeras, raíces y tubérculos, se alejan varios kilómetros de las casas de sus propietarios en busca de alimento y frecuentemente andan en piaras, son buenos para el pastoreo.^{2,3}

La constante introducción de razas mejoradas de cerdos en las explotaciones porcinas, ha hecho que el cerdo Pelón Mexicano esté en peligro de ser absorbido hasta la extinción,³ por considerarse una variedad no mejorada y sin atributos comerciales, sin pensar que su germoplasma es un recurso único y no renovable.³

Es probable que las poblaciones de cerdos pelones posean algunas características útiles determinadas genéticamente, especialmente en lo que se refiere a resistencia de enfermedades y a la adaptación a las condiciones naturales. Igualmente pueden ser una base importante para la mejora de razas comerciales que se quieran introducir a condiciones tropicales.¹

Mucho se habla de la adaptabilidad de las razas indígenas a las condiciones adversas del medio ambiente, igualmente se presume que pueda existir resistencia a parásitos y a algunas enfermedades virales o bacterianas. El cerdo Pelón Mexicano a nivel rural no recibe ningún control de las enfermedades existentes en las regiones donde se cría.²

La importancia que tienen los cerdos de razas indígenas como posibles portadores de agentes infecciosos y con ello generador de valiosa información, es determinante dentro de los programas de control y erradicación de enfermedades, debiéndose hacer conciencia sobre la necesidad de atención a este grupo.³

Uno de los factores que determina el desarrollo de la porcicultura nacional, incluida la rural, es la presencia de enfermedades. Hoy en día sabemos que los agentes etiológicos que afectan a nuestros cerdos son mas

problemáticos y difíciles de controlar, en especial si hablamos de agentes virales. Un excelente ejemplo es el caso de la Fiebre Porcina Clásica, considerada como uno de los padecimientos que generan grandes pérdidas económicas en el país, además de la posibilidad de que se llegue a desencadenar otro tipo de agentes bacterianos y virales, como el virus de la enfermedad del ojo azul también enzootico en México.^{2,3}

2.1.2. Fiebre Porcina Clásica

La Fiebre Porcina Clásica (FPC) es una enfermedad de distribución mundial, que causa grandes pérdidas e impacto económico en la porcicultura, debido a que produce elevada morbilidad y mortalidad. En México a partir del año de 1973, se inician las primeras acciones para integrar un programa para el control de esta enfermedad, pero es hasta 1980 que se establece la “Campaña para el control y erradicación de la Fiebre Porcina Clásica”.⁴

La ausencia de sistemas adecuados para el control de la movilización de cerdos, de prácticas de bioseguridad en las explotaciones pecuarias y de biológicos seguros y eficaces, favorecieron la difusión del padecimiento en amplias zonas del país.⁴

La Fiebre Porcina Clásica es causada por un virus que pertenece a la familia *Flaviviridae*, género *Pestivirus*. Se excreta en las secreciones lagrimales, nasales, orina y heces. La principal forma de transmisión es por contacto directo entre cerdos infectados y los susceptibles, con excreciones y secreciones de los animales enfermos. El virus infecta y se replica inicialmente en las células epiteliales de las criptas tonsilares y de ahí se difunde a los tejidos linfoides, multiplicándose en las células del tejido retículo endotelial.^{5,6}

Como resultado de la diseminación, el nivel de viremia es alto, ocasionando leucopenia y trombocitopenia; manifestándose una inmunosupresión, lo que hace al animal más susceptible a las infecciones secundarias. La causa principal de muerte no se conoce, se considera que el animal muere al ocurrir una liberación masiva de sustancias vasoactivas y el consecuente choque.⁵⁻⁷

La infección puede ser aguda, crónica y crónica tardía, dependiendo de la virulencia del agente (alta, moderada, baja). Entre los signos principales están la fiebre (41°C), al mismo tiempo habrá leucopenia marcada, es posible encontrar trombocitopenia, conjuntivitis, cianosis, ataxia, convulsiones, anorexia, depresión, letargo, tremor muscular y apatía. Además se observa eritema y pústulas en la piel. Los signos nerviosos, en particular las convulsiones, ocurren en las últimas etapas de la enfermedad.⁵⁻⁷

En casos agudos, la muerte normalmente sobreviene entre los cuatro y ocho días posteriores a la infección, en los casos agudos después de 9 a 19 días. En la forma crónica de la FPC se pueden observar tres fases. En la primer fase encontramos anorexia, depresión, elevación de la temperatura y leucopenia. La segunda fase aparece semanas después en donde los cerdos parecen mejorar y la tercer fase nuevamente se observa anorexia y depresión previamente a la muerte.⁵⁻⁸

Los cerdos recuperados de la infección generalmente excretan virus hasta que los anticuerpos específicos se desarrollan. Así los cerdos infectados con virus virulentos, excretarán grandes cantidades de virus durante 10 a 20 días, mientras que en infecciones en los recién nacidos, con cepas de baja patogenicidad, se caracterizan por periodos cortos de excreción viral.^{8,9}

En casos crónicos encontramos hemorragias múltiples de varios tamaños, causadas por necrosis de las células endoteliales que recubren el sistema vascular y úlceras algunas veces de forma botonosa en válvula ileocecal y ciego, son comunes.⁷

La rápida difusión de la enfermedad, mortalidad, leucopenia y lesiones a la necropsia son suficientes para integrar con mucha certeza un diagnóstico presuntivo. Las pruebas de laboratorio se basan en la detección del antígeno viral, aislamiento del virus, o demostración de anticuerpos contra el virus.⁸

En México, a partir del año 1973 se iniciaron las primeras acciones, con la finalidad de integrar un programa en la zona noroeste y en 1980 se establece la "Campaña para el control y erradicación de la fiebre porcina clásica". Desde esa fecha la campaña se basó en mantener acciones de vacunación intensiva.

A partir de 1990 se reorganiza la campaña bajo las bases de concertación y participación directa de los productores. La campaña se integra por 3 fases: control, erradicación y libre.^{9,10}

La fase de control de la FPC, se ha realizado con base en la vacunación intensiva de los cerdos, disminuyendo la incidencia a través de los años. Actualmente se cuenta con la vacuna PAV 250, elaborada con virus vivo modificado, que es inocua para los animales y proporciona excelente inmunidad.¹⁰ Cuando en una región que está en fase de control no se presentan brotes de FPC durante un año, esta región podrá pasar a la fase de erradicación, y si pasa un año más sin brotes de FPC, entonces podrá pasar a la fase libre de FPC.¹⁰

Las vacunas contra la FPC que ha demostrado mayor eficacia y seguridad es la vacuna PAV 250 cultivada en la línea celular PK 15. En México, por ley, cada lote de vacuna producido, es probado en cuanto a su inocuidad, potencia y no diseminación, por la Dirección General de Sanidad Animal (SAGARPA)¹⁰

Desde que se realizaron los primeros estudios, el virus vacunal PAV 250, (Pig Attenuated Virus) demostró que no se diseminaba de los cerdos vacunados a los susceptibles puestos en contacto. Por lo cual no existen posibilidades de que se torne virulento, y se transmita de cerdo a cerdo. La vacuna PAV-250 puede ser aplicada en animales de uno a 21 días de edad, a dosis doble, sin que sea patógena para ellos.^{9,10}

Al analizar el historial epizootiológico de la FPC en México, se llega a la conclusión, de que por sus características, la vacuna PAV 250 ha sido la mejor vacuna para el control y erradicación de esta enfermedad en el país.¹⁰

En México se ha descrito el incremento a la infección de la pasteurelosis por medio de cepas vacunales del vFPC, debido a la inmunosupresión de la vacuna, que favorece la infección por *Pasteurella multocida*).¹¹ Este experimento clásico demuestra la predisposición a la colonización bacteriana. La frecuencia actual de FPC, no es tan alta como lo fue en las décadas anteriores a la de los 80's; sin embargo, se han observado clínicamente una

serie de interacciones microbianas, generadas por los cambios en el sistema de crianza intensiva lo que obliga a considerar estas interacciones, para lograr combatir esta enfermedad que sigue siendo la amenaza más costosa de la porcicultura.¹⁰

2.1.3. Enfermedad del ojo azul

La Enfermedad del ojo azul (EOA), es un padecimiento de los cerdos que actualmente es uno de los más graves en el centro del país; demostrando tener un significado económico importante para la porcicultura nacional, ya que durante los brotes se ven afectados los parámetros productivos y reproductivos de la granjas afectadas. Este padecimiento es de origen viral y afecta a los cerdos de diferentes edades. La EOA causa encefalitis, signos reproductivos y opacidad de la córnea. Los signos dependen de la edad del animal.^{11, 12}

Las primeras descripciones de la enfermedad se presentaron en la ciudad de la Piedad Michoacán. En ese momento se observaron brotes de encefalitis y opacidad de la córnea en lechones. El cuadro nervioso presentó características clínico patológicas diferentes a los cuadros de encefalitis previamente descritos en México.¹¹³⁻¹⁵

La enfermedad ha sido diagnosticada únicamente en México, hasta la fecha la única zona libre de la enfermedad es la noroeste. Por el contrario, los estados de Michoacán, Jalisco y Guanajuato representan la zona con mayor incidencia de la misma. También se ha diagnosticado en los estados de México, Querétaro, Hidalgo, Tlaxcala, Puebla entre otros.¹²

El virus de la EOA ha sido clasificado como un miembro de la familia *Paramyxoviridae*, género *Rubulavirus*, constituido por una cadena ácido ribonucleico (ARN), en sentido negativo con una envoltura lipoproteica encerrado en una nucleocápside helicoidal simétrica. El *Rubulavirus porcino* (RvP) reconoce específicamente moléculas que contienen ácido N-acetilneuramínico.^{15,16}

La presencia de receptores celulares, constituye un factor determinante en la susceptibilidad a la infección viral; además, de otros mecanismos que favorecen, inhiben e incluso regulan, el proceso de infección.¹⁷

En el control, regularización o erradicación de una infección viral, el conocimiento de los mecanismos inmunológicos es indispensable. No obstante, diversos virus han logrado evolucionar evadiendo o controlando el sistema inmunitario de su hospedero. Hasta el momento se ha identificado a los cerdos como la única especie susceptible a generar signos clínicos de la infección por el Rvp; experimentalmente el virus puede infectar ratones, ratas, conejos, embriones de pollo y perros sin que estos últimos lleguen a presentar signos clínicos de la enfermedad.¹⁹ La infección producida por el Rvp se trasmite por contacto directo a través de secreciones. La vía de entrada en forma natural es la oronasal. Experimentalmente se ha demostrado que el virus inicia su replicación en mucosa nasal y tonsilas, de ahí se difunde por vías aéreas a los pulmones.²¹

Los signos clínicos dependen principalmente de la edad del animal. En lechones menores a 20 días se presentan signos más severos así como la tasa de mortalidad más alta. Los animales se ven postrados, deprimidos o con problemas nerviosos. Los primeros signos son: fiebre, eritema cutáneo, pelo erizado y lomo arqueado; ésta semiología se acompaña de constipación y en ocasiones diarrea. Posteriormente los animales presentan signos nerviosos progresivos; tales como: incoordinación, hipersensibilidad, debilidad, rigidez, temblores musculares, posturas y marchas anormales. Más tarde, hay postración, letargia, con algunos movimientos involuntarios, mirada perdida, pupila dilatada y ceguera.²¹⁻²⁵

La muerte se presenta entre las 30 y 48 horas después de la postración. En algunos casos el curso es de 48 horas, pero lo más frecuente es que sea de 3 a 5 días. Simultáneamente, algunos animales presentan conjuntivitis, ojo hinchado, lagrimeo, párpados pegados y en 1 al 10% de los afectados hay opacidad de córnea uni o bilateral. Con frecuencia sólo se observa la opacidad corneal, sin signos nerviosos en los lechones.^{24,25}

En cerdos de más de 30 kilos los signos nerviosos son raros y pocos animales mueren. El único cambio observado es la opacidad de la córnea en 1 al 4% de los cerdos. Cuando llegan a presentarse los signos nerviosos existe: anorexia, depresión, incoordinación, marcha en círculo y movimientos pendulares de la cabeza, entre otros. También se presenta conjuntivitis y opacidad de la córnea.¹⁵ Se ha sugerido retraso en el crecimiento y disminución en el consumo de alimento.²⁴ En animales de pie de cría, es poco frecuente que los animales adultos desarrollen opacidad corneal. En sementales, solo existen reportes de campo en donde se asocian los trastornos reproductivos de los verracos a la presencia del virus de la EOA.²⁴

Los cambios macroscópicos que se le atribuyen a la infección por el virus de la EOA, son escasos y ocasionalmente están ausentes. Frecuentemente se observa congestión meníngea con aumento variable del volumen del líquido cerebroespinal y neumonía, la cual se aprecia en los bordes ventrales de los lóbulos craneales y con extensión del 1 al 5% del parénquima. Los pulmones no se colapsan. La opacidad de la córnea por edema se aprecia con baja frecuencia en los cerdos muertos por la enfermedad, ésta generalmente es unilateral. En cerdos mayores de 30 días y convalecientes, la córnea edematosa llega a tener un grosor de hasta 3mm, el humor acuoso es escaso.²⁶

Los principales cambios histológicos se localizan en el sistema nervioso central. En animales infectados se presenta meningoencefalitis no supurativa que afecta principalmente al tálamo, cerebro medio y corteza cerebral.^{25,26}

El diagnóstico del agente etiológico se realiza mediante pruebas de aislamiento viral, e identificación por inmunofluorescencia, microscopia electrónica a partir de encéfalo, tonsilas, pulmón y monoestratos de células infectadas. La detección de anticuerpos se efectúa por medio de técnicas como la de inhibición de la hemaglutinación, virus sueroneutralización, ELISA y PCR.²⁴

No hay tratamiento específico que pueda usarse en contra del virus, la medicación en contra de infecciones bacterianas ayuda para disminuir la mortalidad y los retrasos en el crecimiento.^{24,25}

Al seguir las medidas sanitarias preventivas, se reduce al mínimo el riesgo de adquirir la enfermedad.

Pocos estudios experimentales se han realizado para comprobar el efecto de bacterias y virus en el cerdo Pelón Mexicano. Vizuet demostró que el cerdo Pelón es susceptible al Rubulavirus productor de la Enfermedad del ojo azul, cuando éste es inoculado por vía intramuscular y oronasal.²⁷

2.1.4. Respuesta inmune del cerdo.

En el cerdo, así como en otras especies domésticas, existe un conjunto de barreras mecánicas, químicas y biológicas, que limitan en gran medida el ingreso de agentes infecciosos al organismo. Cuando estas barreras son superadas, las células del sistema inmune innato y del sistema inmune adquirido se encargan del control. Entre las células que participan en la respuesta inmune innata se encuentran: los granulocitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, células presentadoras de antígenos (CPA) (macrófagos y células dendríticas), células NK (importantes en infecciones virales). Otros mecanismos importantes dentro del sistema innato de defensa son: el complemento, las citocinas e interferones, siendo estos dos últimos de gran importancia en la “comunicación” del sistema inmune.²⁷⁻²⁹

El sistema inmune adquirido está compuesto por los linfocitos B y T. Los primeros se encargan de la producción de anticuerpos, importantes para neutralizar virus y toxinas bacterianas. Los segundos se dividen en linfocitos T citotóxicos y linfocitos T cooperadores. Ambos se activan una vez que las CPA han procesado los diferentes antígenos y los presentan asociados al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC por sus siglas en inglés), clase I para el caso de los linfocitos citotóxicos, o a la clase II para los linfocitos cooperadores. La inmunidad adquirida es muy importante en todos los animales domésticos, ya que presenta la característica de tener “memoria inmunológica”.²⁷⁻²⁹

En el cerdo se han identificado las IgG, IgM, IgA, e IgE, aunque también se ha supuesto la existencia de la IgD como en la especie humana. Estudios serológicos describen 4 subclases de IgG, siendo la IgG1 la que predomina en

el cerdo. La IgG comprende alrededor del 88% del suero, 80% del calostro y 20-30% de la leche. Los niveles séricos de la IgA son de aproximadamente 3%, 14% en calostro y 82% en leche. En cuanto a la IgM, comprende un 14% del suero, 6% del calostro y 18% de la leche.²⁸

2.1.5. Características de los linfocitos porcinos.

De acuerdo a sus funciones y a algunas moléculas que se expresan en la superficie, los linfocitos T se pueden dividir en linfocitos CD4 o cooperadores y en linfocitos CD8 o citotóxicos. Los linfocitos CD4 son los responsables de regular la respuesta inmune, con la producción de citocinas como la IL-2, el IFN γ , la IL-4 y la IL-10 que activa a los macrófagos, linfocitos B y T; basándose en el patrón de las citocinas, los linfocitos cooperadores se dividen en Th1 y Th2. Los linfocitos CD8 se encargan de la citotoxicidad, restringida por las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad Clase I y son importantes en las infecciones intracelulares. El cerdo es la única especie que expresa altos porcentajes de linfocitos dobles positivos CD4⁺CD8⁺ en la sangre periférica(entre 10% y 60%). Estos porcentajes se conservan en órganos linfoides secundarios en condiciones normales.^{29,30}

Saalmüller y Pescovitz fueron los primeros en identificar la presencia de linfocitos CD4⁺CD8⁺ en el cerdo y en proponer dos hipótesis de sus posibles actividades biológicas, la primera: estas células pueden representar linfocitos inmaduros que emigraron del timo sin perder alguno de sus marcadores y la segunda: estas células representen linfocitos CD4 que han adquirido el marcador CD8 después de su sensibilización y lo retienen para convertirse en linfocitos pequeños. La primera hipótesis fue rechazada, ya que estos linfocitos no expresan el marcador CD1 que identifica a timocitos; la segunda hipótesis es la más aceptada. Los resultados indican que los linfocitos CD4⁺ adquieren el marcador CD8 para convertirse en linfocitos CD4⁺CD8⁺, después de una respuesta *in vitro* a estímulos alérgicos, virales y parasitario. Esta respuesta está restringida al MHC-II.²⁹⁻³³

2.1.6. Aspectos generales de la inmunidad frente a los virus.

Los virus inician su proceso de infección al reconocer a un receptor específico como una célula blanco, la cual puede o no ser susceptible de ser infectada. Cuando un virus infecta a una célula, subsecuentemente altera sus funciones metabólicas. Dentro de la célula, el virus inicia la transcripción de sus proteínas y utiliza las enzimas de la célula infectada; éstas últimas le permiten la producción de partículas víricas capaces de infectar a otras nuevas células blanco.³³⁻³⁴

Una eficaz respuesta inmune celular y humoral son condiciones necesarias para el control y erradicación de las infecciones virales. La reacción que se genera también depende del tipo de virus, vía de entrada, la dosis infectante, tipo de célula presentadora y estado general del hospedador.³⁴

La respuesta inmune frente al virus se inicia con la producción de interferón beta, por las células infectadas, lo que aumenta el potencial lítico de células las NK y la expresión del MHC-I.³⁴

El aumento de la expresión del MHC-I facilitará la acción de los linfocitos T citotóxicos CD8. La presencia de linfocitos T CD8 con actividad citotóxica se ha demostrado en diferentes modelos de infecciones virales, se sugiere que juegan un papel importante para el control de la infección.^{36,37}

El resultado de la actividad citotóxica de las diversas células efectoras (NK, linfocitos CD8 ó CD4) sobre las células infectadas, provoca que se liberen antígenos virales endógenos. Estos pueden ser fagocitados, procesados y presentados como antígenos exógenos por el MHC-II. Este proceso induce la proliferación de linfocitos cooperadores CD4⁺. Estos responden con la producción de citocinas como la IL-2 e interferón-gama ó IL-4 e IL-10. Durante la infección aguda, no es posible discriminar entre una respuesta Th1 ó Th2, ya que predomina la producción de ambas. En los procesos crónicos es posible identificar un patrón de producción Th 2 que favorecen muchas de las infecciones persistentes.²⁹

2.2. Justificación

En zonas de control de la fiebre porcina clásica, es frecuente observar otros agentes infecciosos causantes de enfermedades, tales como Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS), enfermedad de aujeszky, enfermedad del ojo azul, neumonías etc. Debido a ello es común que se deje de vacunar contra fiebre porcina clásica, por el temor de propiciar la proliferación de estos agentes infecciosos y generar enfermedades de tipo diarreico, nervioso, respiratorio y sistémico.

2.3. Hipótesis

En los cerdos Pelón Mexicano vacunados con la vacuna PAV 250 e inoculados con el virus de la Enfermedad del ojo azul, generan más alteraciones en sus subpoblaciones linfocitarias sanguíneas y en la respuesta inmune humoral, que en los animales sólo vacunados ó solamente inoculados.

2.4. Objetivos generales

Cuantificar las subpoblaciones de células mononucleares de la sangre periférica de cerdos jóvenes Pelón Mexicano. Evaluar el efecto de la vacuna contra la fiebre porcina clásica (PAV- 250) y la inoculación del virus de la enfermedad del ojo azul, en cerdos Pelón Mexicano.

2.5. Objetivos específicos

2.5.1. Cuantificar las subpoblaciones de células mononucleares de la sangre periférica de cerdos jóvenes Pelón Mexicano.

2.5.2. Determinar las subpoblaciones de linfocitos en la sangre periférica de cerdos Pelón Mexicano, inmunizados contra fiebre porcina clásica e inoculados con el virus de la enfermedad del ojo azul.

2.5.3. Determinar la respuesta humoral (anticuerpos específicos) contra la Enfermedad del ojo azul y contra la fiebre porcina clásica, en cerdos Pelón

Mexicano inmunizados contra la fiebre porcina clásica e inoculados con el virus de la enfermedad del ojo azul.

2.5.4. Determinar antígenos virales de la Enfermedad del ojo azul y de la fiebre porcina clásica en cerdos Pelón Mexicano, inmunizados contra la fiebre porcina clásica, e infectados con el virus de la enfermedad del ojo azul.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Para facilitar la investigación el trabajo se realizó en dos etapas. La primera de ellas consistió en cuantificar las subpoblaciones linfocitarias en la sangre periférica de cerdos Pelón Mexicano sanos; y la segunda en cuantificar las mismas células en los animales vacunados con la PAV 250 e inoculados con el virus de la enfermedad del ojo azul, utilizando los grupos control adecuados.

3.1. ETAPA I

3.1.1 Animales

Se utilizaron 10 animales Pelón Mexicano con una edad promedio de 2 meses, serológicamente negativos a la presencia de anticuerpos contra la enfermedad del ojo azul, enfermedad de aujeszky, PRRS y fiebre porcina clásica. Se les proporcionó alimento comercial. El agua se administró *ad libitum*. Los animales se identificaron con aretes con números progresivos del 1 al 10.

3.1.2. Diseño experimental

Previo a la inmunización y desafío de los animales, se cuantificaron las células mononucleares (CMN), de la sangre periférica de cerdos Pelón Mexicano sanos. Se obtuvieron muestras de sangre dos veces por semana de todos los animales, durante mes y medio. Durante esta etapa se separaron y cuantificaron obteniéndose los porcentajes de las siguientes subpoblaciones de linfocitos T $CD4^+CD8^-$, $CD4^-CD8^+$, $CD4^+CD8^+$, $CD4^-CD8^-$.

3.1.3. Separación de células linfocitarias

La sangre de los cerdos colectada en los tubos que contenían heparina se mezcló con el mismo volumen de un gradiente de concentración (Ficol-

Histopaque 1077), posteriormente se centrifugó (800 g/30min), se lavó 3 veces con solución amortiguadora de fosfatos (PBS). Las CMN se colectaron a partir de la interfase que se formó. Se lavaron dos veces con medio de cultivo RPMI-1640 sin suero (700 g/5min) y posteriormente se resuspendieron en 5 ml RPMI-1640 adicionado con 10% de suero fetal bovino. Se determinó su viabilidad con azul tripan y se ajustaron a una concentración final de células viables de 1×10^6 /ml.

3.1.4. Identificación de las subpoblaciones linfocitarias.

Con las CMN ajustadas se hizo la identificación de las subpoblaciones: Para identificar las células se realizaron 2 incubaciones. En la primera incubación se utilizaron anticuerpos monoclonales: anti-CD4 (IgG_{2b} 74:12.4), anti-CD8 (IgG_{2a} 76-2-11), anti gamma-delta (PPT-16) elaborados en ratón obtenidos de VMRD Inc. (Washington USA). En la segunda incubación se utilizaron anticuerpos policlonales elaborados en cabra, anti-IgG de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Becton&Dickinson, Mountain, Cal USA), un anticuerpo monoclonal de rata anti-IgG_{2a} de ratón conjugado con Ficoeritrina (PE) (Zymed Laboratories Inc, USA), un anticuerpo monoclonal de rata anti IgG1 de ratón, conjugado PE (Serotec Reino Unido).

Las concentraciones óptimas para cada anticuerpo fueron determinadas previamente. Ambas incubaciones fueron de 15 minutos a 4°C y entre cada una las células se lavaron dos veces con solución buffer (PBS; pH 7.2, BSA 0.2%, Nz3N 0.1%, EDTA 0.01%). De las células marcadas se analizaron 100,000 para cada subpoblación por citometría de flujo (FACSCalibur, Becton&Dickinson, Mountain, Cal).

3.2. ETAPA II

3.2.1. Animales

Se utilizaron 12 animales Pelón Mexicano de 8 a 10 Kg. de peso, con una edad promedio de 2 meses, serológicamente negativos a la presencia de anticuerpos contra la enfermedad del ojo azul, enfermedad de aujeszky, PRRS

y fiebre porcina clásica. Se les dio alimento comercial para cerdos. El agua se administro *ad libitum*.

Los animales se identificaron con aretes con números progresivos del 1 al 12, para posteriormente formar cuatro grupos de tres animales cada uno.

3.2.2. Diseño experimental

Esta etapa consistió en la identificación y cuantificación de las células linfocitarias de la sangre periférica, linfocitos T: $CD4^+CD8^-$, $CD4^-CD8^+$, $CD4^+CD8^+$, $CD4^-CD8^-$ de cerdos Pelón Mexicano durante el periodo posvacunal y posdesafío.

Los animales se dividieron en cuatro grupos. Definiéndose al Grupo 1 con los cerdos que recibieron el número 1, 3, y 6; al Grupo 2 los cerdos 2, 4, y 5; Grupo 3 cerdos 7, 8, y 9 y Grupo 4 cerdos 10, 11, y 12.

El primer grupo fue vacunado con la PAV 250.

El segundo grupo fue vacunado con la PAV 250 y tres días después inoculado por instilación nasal con el virus de la enfermedad del ojo azul.

El tercer grupo sólo se inoculó con el virus de la enfermedad del ojo azul

El cuarto grupo sirvió como testigo, al cual se le aplicó la misma dosis (2ml), pero del diluyente de la vacuna y se le inoculó solución salina fisiológica por instilación nasal (5ml).

El trabajo se hizo con los cuatro grupos de forma simultánea; con una duración total de 18 días. Todos los días se registro la temperatura rectal a los doce animales y fueron evaluados clínicamente; cada tercer día se tomaron muestras sanguíneas para ser analizadas por biometrías hemáticas, serología y citometría de flujo. Se tomaron hisopos nasales a los cuatro grupos tres veces a la semana.

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	
Día menos uno	Toma de muestras sanguíneas
Día cero	Vacunación de los animales del Grupo 1 y 2. Grupo 4, aplicación de diluyente de la vacuna. Toma de muestras sanguíneas
Día dos	Toma de muestras sanguíneas
Día tres	Inoculación del virus de la enfermedad del ojo azul a los Grupos 2 y 3. Grupo 4, aplicación de solución salina fisiológica como inóculo. Toma de muestras sanguíneas
Día 5,8,10,12,15,17	Toma de muestras sanguíneas
Día dieciocho	Sacrificio de los 12 animales

3.2.3. Instalaciones

En ambas etapas se utilizaron las unidades de los aislamientos y el laboratorio de diagnóstico del Departamento de Producción Animal: Cerdos pertenecientes a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

3.2.4. Virus

Rubulavirus porcino:

Se trabajó con el *Rubulavirus porcino* aislado el año 1990, llamado Producción Animal Cerdos, aislamiento número tres (PAC3). Esta cepa ocasiona signos nerviosos de incoordinación y muerte en lechones, reabsorciones y momificaciones en cerdas gestantes, además de orquitis en machos.

Para realizar el aislamiento viral, se obtuvo el encéfalo de un animal de destete, que manifestó signos nerviosos durante un brote de la enfermedad del ojo azul en una granja reproductora.

Para la caracterización del virus se han llevado a cabo diversos estudios:

1. Efecto Citopático
2. Hemaglutinación
3. Hemadsorción
4. Inmunofluorescencia
5. Purificación Viral
6. Seroneutralización e inhibición de la hemoaglutinación³⁸⁻⁴²

3.2.4.1. Titulación viral

Las células VERO se ajustaron a 25 000 células por pozo en medio mínimo de cultivo, (MEM Sigma), adicionado con 10% de suero fetal bovino. Se utilizaron placas de 96 pozos de fondo plano estériles (NUNC) adicionándoles 150 μ l de la suspensión de las células. Una vez formado el monoestrato (24 horas) se prepararon diluciones décuples del virus (10^0 hasta 10^9) y se adicionaron 50 μ l de cada dilución por pozo, cada una con ocho repeticiones. Después de 72 h de incubación se colectaron 50 μ l de los sobrenadantes, transfiriéndolos a otra placa de 96 pozos de fondo en U y se les determino su actividad aglutinante utilizando glóbulos rojos de ave al 0.5%. Los resultados se expresaron como dosis infectante para cultivos celulares 50% (DICC₅₀), usando el método de Karber.³⁸⁻⁴⁰

El virus utilizado para realizar los pruebas *in vitro*, así como para la inoculación de los animales, tuvo un título de 64 unidades hemaglutinantes (UH). Por efecto citopático presentó un título de $10^{6.5}$ DICC (dosis infectantes en cultivo celular).

3.2.5. Vacuna

La vacuna que se aplicó fue la SUVAXYN FPC-250 (PAV-250) vacuna de virus vivo modificado, donada por el laboratorio FORT DODGE ANIMAL HEALTH, a una dosis de 2ml vía intramuscular a cada animal. La vacuna PAV 250 ha sido la mas usada en la campaña de control y erradicación de la fiebre

porcina clásica en México desde 1998 a la fecha, por las bondades que presenta.

3.2.6. Obtención de las muestras de sangre

El sangrado de los animales se efectuó a partir del golfo de las yugulares, donde se obtiene sangre de la vena cava anterior o de la yugular. La sangre fue repartida en tubos de vacutainer con heparina, y en tubos sin anticoagulante.

3.2.7. Biometrías Hemáticas

Las técnicas que se emplearon fueron las siguientes. Para medir hematocrito: micro hematocrito; para la hemoglobina: cianohemoglobina; para determinar la cuenta total de leucocitos, eritrocitos y el conteo de plaquetas se utilizó el método directo.³⁸

3.2.8. Respuesta humoral

Se tomaron muestras sanguíneas de todos los animales, antes y durante la investigación, cada tercer día. Todas las muestras fueron analizadas mediante la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IHA), con eritrocitos de bovino al 0.5%, para la detección de anticuerpos contra la EOA; y para la FPC se usó la técnica de ELISA.

Detección de anticuerpos contra EOA por la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación (IHA)

Para la realización de esta técnica se utilizó el método beta, este consiste en hacer diluciones del suero y agregar un volumen igual de la suspensión del virus, previamente titulado (8 unidades hemaglutinantes). Previo a la realización de la prueba de IHA, el complemento de los sueros fue inactivado durante 30 minutos a 56°C en baño maría. Posteriormente fueron adsorbidos con caolín y eritrocitos de bovino al 5%, durante 24 horas a 4°C, esto con el fin de eliminar inhibidores inespecíficos de la hemaglutinación.

Para la titulación de los sueros se emplearon placas, que constan de 96 pozos con fondo en "U". Se realizan titulaciones por duplicado. En cada fila se agregaron 50 µl de solución salina por pozo. Se colocaron 50 µl del suero de los casos problema en el primero y segundo pozos de cada hilera. La dilución del suero se inició a partir de estos últimos. Las diluciones de cada suero fueron desde 1: 2 hasta 1: 256. Después de diluir se agregó el virus, calculando 8 unidades hemaglutinantes. Se permitió que se realizara la reacción durante una hora a 25°C. Finalmente a cada pozo se le agregaron 50 µl de eritrocitos de bovino al 0.5%.⁴¹ La lectura se hizo a los 60 minutos. Considerándose los sueros como positivos a partir de títulos de 1:16.

Detección de anticuerpos contra FPC en suero por la Técnica de ELISA

El "Kit" de ELISA (HerdChek*Elisa Test Kit IDEXX), detecta anticuerpos específicos contra el virus de la fiebre porcina clásica (VFPC). El ensayo es una ELISA de bloqueo que utiliza placas de microtitulación cuyo fondo está cubierto con el antígeno del VFPC. Los anticuerpos presentes en el suero bloquean la unión de los anticuerpos monoclonales específicos del virus conjugados con peroxidasa. El resultado se indica por el desarrollo del color y la densidad óptica. La densidad óptica se mide con un lector de microplacas a una longitud de onda de 450 nm o una longitud de onda dual de 450 nm y 620 nm. El desarrollo de color es débil cuando los anticuerpos específicos VFPC se encuentran en el suero. El desarrollo de color es máximo cuando hay ausencia de anticuerpos específicos en el suero. El porcentaje de bloqueo del suero, se calcula a partir de la densidad óptica del mismo y la densidad óptica del control negativo.

3.2.9. Aislamiento Viral

Aislamiento del VEOA en cultivo celular:

Se realizaron macerados del encéfalo, tonsilas y bazo de cada animal; se centrifugaron a 700 g/30 min a 4°C. El sobrenadante de los macerados

fue pasado por filtros (millipore) de 1.2 y 0.45 μm , para obtener el inóculo libre de bacterias. Del filtrado se inocularon 200 μl en monocapas de células de riñón de mono verde (VERO), sembradas 48 horas antes, en placas de 24 pozos (NUNCILON™ Surface.). Para favorecer la adsorción, el inóculo se dejó sobre los monoestratos celulares durante una hora a 37°C. Posteriormente se retiró el inóculo y se lavaron las monocapas 3 veces con medio de cultivo (Eagle's MEM).⁴³ Se agregaron aproximadamente 2.2 ml de medio de cultivo en cada pozo conteniendo 100 UI/ml de penicilina y 0.1 mg de estreptomicina. Se incubaron durante 7 días a 37°C con una atmósfera de CO₂ al 5%. Después de este tiempo el sobrenadante se tituló por la técnica de hemoaglutinación utilizando eritrocitos de ave al 5%. Se le dieron dos pases más al sobrenadante, en cada uno se tituló nuevamente.⁴³

Detección de virus vacunal de FPC en suero por la técnica de ELISA

Chekit CSF- Virus III Bomelli.

Este "Kit" provee un método sensible, específico y sencillo de detección de la glicoproteína E^{rns} (gp44/48) estimulados por el virus de campo de la Fiebre Porcina Clásica.

El fondo de los pozos de la microplaca están cubiertos con anticuerpos en contra de la glicoproteína E^{rns} del virus de la FPC. La presencia de la glicoproteína E^{rns} en suero y plasma ó asociada a tejidos resultará en una unión específica con los anticuerpos anti-E^{rns} que se localizan en el fondo de los pozos. Todo el material que no se adhiera es lavado, enseguida, un conjugado anti- E^{rns} marcado con peroxidasa será añadido, el cual se pegará a la glicoproteína E^{rns} que se encuentra a su vez unida a los anticuerpos en el fondo de la placa. El conjugado que no se une es lavado y desechado, posteriormente se añade el cromógeno. El grado de color que se desarrolla es directamente proporcional a la cantidad de glicoproteína E^{rns} presente en la muestra: La relevancia diagnóstica del resultado es obtenida por comparación con la densidad óptica que se desarrolla en los pozos que contienen los controles negativos y positivos. La

densidad óptica se mide con un lector de microplacas a una longitud de onda de 405 nm.

3.2.10. Separación de células mononucleares

La separación de las células mononucleares se hizo de la misma forma que en el punto 3.1.3.

3.2.11. Identificación de las subpoblaciones linfocitarias

A partir de las CMN contadas, se hizo la identificación de las subpoblaciones:

Para identificar las células se realizaron 2 incubaciones. En la primera incubación se utilizaron anticuerpos monoclonales: anti-CD4 (IgG_{2b} 74:12.4), anti-CD8 (IgG_{2a} 76-2-11), anti gamma-delta (PPT-16) elaborados en ratón obtenidos de VMRD Inc. (Washington USA). En la segunda incubación se utilizaron anticuerpos policlonales elaborados en cabra, anti-IgG de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Becton&Dickinson, Mountain, Cal USA), un anticuerpo monoclonal de rata anti-IgG2a de ratón conjugado con Ficoeritrina (PE) (Zymed Laboratories Inc, USA), un anticuerpo monoclonal de rata anti IgG1 de ratón, conjugado PE (Serotec Reino Unido).

Las concentraciones óptimas para cada anticuerpo fueron determinadas previamente. Ambas incubaciones fueron de 15 min a 4°C y entre cada una las células se lavaron dos veces con solución buffer (PBS; pH 7.2, BSA 0.2%, Nz3N 0.1%, EDTA 0.01%). De las células marcadas se analizaron 100 000 para cada subpoblación por citometría de flujo (FACSCalibur, Becton&Dickinson, Mountain, Cal).

3.2.12 . Análisis de resultados

Se calculó la estadística descriptiva, de las variables bajo estudio, de la población general, para cada uno de los tratamientos, para las etapas evaluadas (siete en total), así como para los tratamientos en cada una de las etapas evaluadas.

Para conocer el efecto de los diversos tratamientos (vacunados, inoculados, vacunados e inoculados y el control) y del tiempo, sobre las variables de interés, se realizó un análisis de varianza empleando los siguientes modelos estadísticos lineales:

Variable Dependiente = M + Tiempo + Tratamiento + Error

Donde:

M es la media general

Tiempo (efecto de, como covariable)

Tratamiento (efecto de)

Error se refiere al residuo

Hay que resaltar que las variables de interés analizadas, en todos los casos, corresponden a la diferencia del valor actual (en cada momento en el tiempo) con respecto a su valor inicial. De este modo, se mide el efecto del tratamiento y del tiempo en el mismo animal, con lo que éste queda como su propio control. Se utilizó también, un segundo modelo igual al anterior, pero que incluyó, además, al efecto del tiempo en su forma cuadrática.

Al final, cuando el efecto cuadrático del tiempo mejoró el ajuste del modelo y resultó estadísticamente significativo ($P < 0.05$), se utilizó dicho modelo en el análisis. Para todos los otros casos sólo se utilizó el modelo que incluyó el tiempo en su forma lineal.

Cuando el efecto de tratamiento resultó significativo ($P < 0.05$), se realizó la prueba de Tukey de comparación de medias, para conocer entre cuales tratamientos existieron diferencias.

Cuando el efecto del tiempo sobre las variables de interés resultó significativo, tanto en su forma exclusivamente lineal, como en el caso donde resultó significativo el efecto lineal y cuadrático, se llevaron a cabo las regresiones lineales de dichas variables con respecto al tiempo, para conocer los parámetros de dicha asociación. De una manera general, dichos modelos pueden presentarse como:

Variable dependiente = $B_0 + B_1 \text{Tiempo} + B_2 \text{Tiempo}^2$

Donde

B_0 es el intercepto

B_1 y B_2 son los coeficientes de regresión asociados a los componentes lineal y cuadrático, respectivamente, del tiempo.

Todo el análisis estadístico se llevó a cabo utilizando la versión 8.2 de SAS

4. RESULTADOS

4.1. ETAPA I

4.1.1. Identificación y cuantificación de las subpoblaciones linfocitarias

Se realizaron un total de 10 tomas de muestras de sangre por animal durante un periodo de mes y medio. Las células mononucleares obtenidas fueron contadas y evaluada su viabilidad para ajustarse a una concentración de 1×10^6 /ml para cada determinación y obtener los valores basales de las subpoblaciones analizadas (linfocitos CD4⁺CD8⁻, CD4⁻CD8⁺, CD4⁺CD8⁺, CD4⁻CD8⁻) en el citómetro de flujo. (Figura 1).

Las poblaciones basales se obtuvieron sacando el promedio de las 10 mediciones que se tomaron a cada uno de los 10 animales, los datos obtenidos se observan en el cuadro no. 1 (figura 2).

Cuadro 1. Promedio de células mononucleares en la sangre periférica de cerdos Pelón Mexicano sanos.

Tipo de célula	CD4 ⁺ CD8 ⁻	CD4 ⁻ CD8 ⁺	CD4 ⁺ CD8 ⁺	CD4 ⁻ CD8 ⁻
Animal No.				
1	18.31	49.19	3.51	16.7
2	29.72	38.34	4.21	20.96
3	38.88	29.51	4.82	15.88
4	20.99	28.1	4.57	15.75
5	17.66	40.12	5.15	16.24
6	42.59	34.02	8.9	16.85
7	29.28	26.01	12.45	12.26
8	24.55	38.06	13.01	19.84
9	33.91	53.1	11.7	13.51
10	34.33	34.09	8.65	13.43
Promedio	28.72	37.05	7.70	16.14
Error estándar	(±8.62)	(±8.78)	(±3.70)	(±2.73)

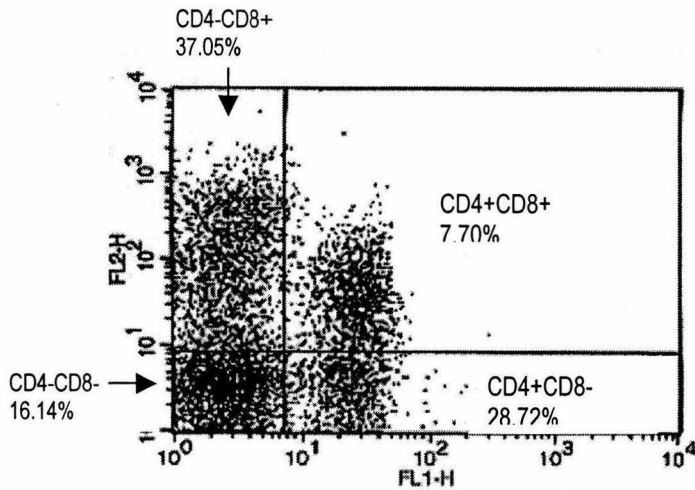


Figura 1. Diagramas de las subpoblaciones linfocitarias en la sangre periférica de cerdos sanos Pelón Mexicano en el citómetro de flujo.

4.2. ETAPA II

Rubulavirus porcino.

4.2.1. Título del virus

El virus utilizado para realizar los pruebas *in vitro*, así como para la inoculación de los animales, tuvo un título de 64 unidades hemaglutinantes (UH). Por efecto citopático presentó un título de $10^{6.5}$ DICC (dosis infectantes en cultivo celular).

4.2.2. Signos clínicos

Los animales fueron observados diariamente, para ver si se presentaba algún signo clínico sugerente de la EOA o de FPC.

En el Grupo 2 (cerdos vacunados con la vacuna PAV 250 e inoculados con el virus de la EOA) se observó anorexia y letargia a las 48 horas posteriores a la inoculación.

En el Grupo 3 (cerdos inoculados con el virus de la EOA) hubo disminución en el consumo de alimento un día después a la inoculación, además de la presencia de estornudos a las 48 horas postinoculación.

En los 2 grupos restantes (el vacunado con la vacuna PAV 250 y testigo) no hubo ningún signo clínico aparente, que nos indicara algún cambio en su comportamiento.

4.2.3. Temperaturas

Las temperaturas rectales fueron evaluadas diariamente en los doce animales, durante el tiempo que duro la fase experimental. Se encontró que el Grupo 3 inoculado con el virus de la EOA exclusivamente y el Grupo 2 con doble tratamiento (inoculado con VEOA y vacunado con la vacuna PAV 250) presentaron aumento de temperatura a las 24 y 48 horas posteriores a la inoculación del VEOA; sin que estos aumentos fueran considerados como fiebre, (Figura 3).

Estadísticamente no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los grupos, en ninguna etapa de la fase experimental ($P < 0.05$). En el Cuadro 2 se muestran los promedios y desviaciones estándar de las temperaturas rectales de los cerdos durante la fase experimental donde se observa que los grupos 2 y 3 tienden a incrementar su temperatura corporal el día 4 y 5 del experimento.

Cuadro 2. Temperatura rectal de cerdos Pelón Mexicano durante el estudio.

Promedios de temperatura rectal en grados centígrados.										
Días de estudio										
	Día 0*	Día 1	Día 2	Día 3**	Día 4	Día 5	Día 8	Día 10	Día 12	Día 15
Grupo 1	38.33	38.5	38.67	38.2	38.60	38.37	38.57	38.37	38.67	39.00
(PAV 250)	± 0.29	± 0.12	± 0.21	± 0.35	± 0.10	± 0.32	± 0.12	± 0.32	± 0.29	± 0.50
Grupo 2	38.50	38.3	38.6	38.7	39.50	39.40	38.57	38.93	38.50	38.83
(PAV 250 y VEOA.)	± 0.00	± 0.12	± 0.06	± 0.15	± 0.17	± 0.50	± 0.12	± 0.12	± 0.50	± 0.29

Grupo 3	38.40	38.63	38.70	38.6	39.00	39.20	39.10	38.93	38.57	38.83
(VEOA)	±0.00	±0.15	±0.30	±0.50	±0.17	±0.50	±0.12	±0.12	±0.50	±0.29
Grupo 4	38.33	38.47	38.30	38.50	38.67	38.33	38.63	38.50	38.67	38.50
(Testigo)	±0.29	±0.47	±0.12	±0.50	±0.29	±0.29	±0.32	±0.46	±0.29	±0.50

Valores medios ± desviación estándar.

*Vacunación contra la FPC

**Inoculación con VEOA

4.2.4. Biometrías hemáticas

Las muestras de sangre de todos los animales se analizaron por medio de biometrías hemáticas, para evidenciar y detectar posibles alteraciones relacionadas a los diferentes tratamientos aplicados, en cuanto al número y tipo de célula sanguínea durante el estado de viremia. Los valores obtenidos en los cerdos vacunados e infectados experimentalmente se compararon con los valores de los cerdos utilizados como testigos. En general los valores de la biometría hemática no se vieron alterados en ninguno de los tratamientos.

Los valores de los leucocitos y linfocitos sanguíneos de los animales de los 4 grupos fueron evaluados estadísticamente, (cuadro 3 y 4), posteriormente se hizo el análisis de varianza (Cuadro 7 y 8 Anexo).

Los valores de los leucocitos resultaron con diferencias estadísticamente significativas través del tiempo ($p < 0.001$), lo que causó una baja en la cuenta de glóbulos blancos en los cerdos vacunados con la PAV 250, sin que esta disminución se saliera de los rangos fisiológicos normales, (12.0 - 22.0 $10^9/L$).

Cuadro 3. Promedio de leucocitos ($10^9/L$) \pm SD) en la sangre periférica de cerdos Pelón Mexicano durante la fase experimental

No. de leucocitos ($10^9/L$) \pm SD) en la sangre periférica de cerdos Pelón Mexicano.

Fase experimental								
	Día 0*	Día 1	Día 5**	Día 8	Día 10	Día 12	Día 15	Día 17
Grupo 1	19.6	14.8	19.4	18.0	19.0	20.1	21.3	18.8
(PAV 250)	(± 4.9)	(± 3.4)	(± 7.0)	(± 4.4)	(± 6.5)	(± 1.9)	(± 3.2)	(± 2.9)
Grupo 2	18.0	16.2	18.0	18.4	21.6	20.8	19.0	20.8
(PAV 250 y VEOA.)	(± 2.3)	(± 2.8)	(± 5.3)	(± 3.8)	(± 2.8)	(± 2.6)	(± 4.5)	(± 1.1)
Grupo 3	17.2	18.9	18.7	18.3	25.0	18.0	19.3	21.4
(VEOA)	(± 3.4)	(± 4.0)	(± 4.2)	(± 3.1)	(± 4.5)	(± 1.4)	(± 3.7)	(± 4.1)
Grupo 4	17.8	17.9	18.2	19.0	20.2	21.9	19.8	21.1
(Testigo)	(± 4.7)	(± 3.6)	(± 1.7)	(± 8.5)	(± 4.7)	(± 2.9)	(± 4.3)	(± 2.9)

Valores medios \pm desviación estándar.

*Vacunación contra la FPC.

**Inoculación del VEOA .

Los valores de los linfocitos reflejaron diferencias estadísticamente significativas al tratamiento ($p < 0.05$), en donde se observó una linfopenia del día 1 al 8 en los Grupos 1 y 2.

Cuadro 4. Promedio de linfocitos ($10^9/L \pm SD$) en la sangre periférica de cerdos Pelón Mexicano durante el estudio

No. de linfocitos ($10^9/L \pm SD$) en la sangre periférica de cerdos Pelón Mexicano.

Fase experimental								
	Día 0	Día 1*	Día 5**	Día 8	Día 10	Día 12	Día 15	Día 17
Grupo 1	11.43	6.10	8.5	8.17	10.33	10.877	9.86	11.12
(PAV 250)	(± 5.9)	(± 2.52)	(± 6.18)	(± 4.46)	(± 6.75)	(± 3.94)	(± 1.94)	(± 5.21)
Grupo 2	12.37	10.43	10.13	11.7	12.27	13.13	13.69	12.59
(PAV 250 y VEOA.)	(± 1.3)	(± 1.21)	(± 3.63)	(± 3.37)	(± 2.10)	(± 4.54)	(± 3.46)	(± 1.32)
Grupo 3	7.74	7.65	9.03	10.67	9.6	8.5	9.7	8.92
(VEOA)	(± 1.9)	(± 2.33)	(± 2.46)	(± 2.72)	(± 3.20)	(± 2.34)	(± 2.98)	(± 1.84)
Grupo 4	13.57	13.53	15.03	12.6	15.30	15.03	14.67	13.99
(Testigo)	(± 4.0)	(± 3.27)	(± 1.76)	(± 5.42)	(± 4.61)	(± 0.45)	(± 3.27)	(± 0.98)

Valores medios \pm desviación estándar.

*Vacunación contra la FPC

**Inoculación del VEOA

Se evaluaron estadísticamente las demás células sanguíneas reportadas en la biometría hemática, sin que se encontrara diferencia estadística significativa en ninguno de los tratamientos durante todas las etapas de investigación. (Cuadros Anexo).

4.2.5. Respuesta humoral.

4.2.5.1. Determinación de anticuerpos específicos contra el *Rubulavirus porcino* (PAC 3).

La respuesta humoral al *Rubulavirus porcino* (RvP) se evaluó determinando el título de anticuerpos por inhibición de la hemoaglutinación.

Antes del experimento se comprobó que ninguno de los cerdos tenía anticuerpos contra el RvP.

Los cerdos del grupo testigo y los vacunados contra la fiebre porcina clásica, permanecieron durante toda la investigación serológicamente negativos a la presencia de anticuerpos contra el RvP.

La presencia de anticuerpos en los cerdos de los Grupo 2 y 3 se detectó a partir del día ocho postinoculación. (Figura 6 y 7)

Los resultados obtenidos se describen en el siguiente cuadro:

Cuadro 5. Títulos de anticuerpos contra el virus de la enfermedad del ojo azul detectados por la técnica de inhibición de la hemoaglutinación, en cerdos Pelón Mexicano.

Títulos de Acs.	Grupo 2 PAV 250 y VEOA			Grupo 3 VEOA		
	Días postinoculación			Días postinoculación		
	8	11	13	8	11	13
Negativo	1/3 ^a					
1:4**	1/3	1/3		2/3	2/3	
1:8		1/3	1/3	1/3		
1:16	1/3	1/3	1/3			2/3
1:32			1/3		1/3	1/3

Títulos 1:16 se consideraron como animales positivos.

^aNúmero de cerdos con el respectivo título/número total de cerdos

*Los días 1,4 y 6 PI todos los animales fueron serológicamente negativos a la presencia de anticuerpos contra el VEOA.

**Los títulos están expresados en unidades inhibidoras de la hemaglutinación.

4.2.5.2. Determinación de anticuerpos específicos contra el virus vacunal de FPC.

Los resultados muestran que se detectaron anticuerpos contra el virus vacunal a partir del quinto día postvacunación en los tres animales de ese grupo. Respecto a los animales vacunados e inoculados dieron resultados

positivos a anticuerpos también a partir del día 5, pero sólo en uno de los tres animales del grupo, los otros dos resultaron positivos hasta el día 11 postvacunación (Cuadro 8).

Cuadro 6. Animales positivos a la presencia de anticuerpos contra el virus de FPC detectados por la técnica de ELISA.

Grupo	Días de la investigación postvacunación.							
	1	3	5	8	10	12	15	17
1	-	-	+	+	+	+	+	+
Vacunados contra la FPC*			3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
2	-	-	+	+	+	+	+	+
Vacunados contra la FPC e inoculados con VEOA.*			1/3	2/3	3/3	3/3	3/3	3/3

*Número de cerdos positivos/Total estudiados

4.2.6. Detección de antígenos virales contra la enfermedad del ojo azul y contra la FPC.

4.2.6.1. Detección viral del RvP

- El aislamiento del virus se hizo a partir de macerados de encéfalo, tonsilas, bazo y pulmón, inoculando monocapas de células VERO. Se tomaron sobrenadantes del cultivo del primer pase a los siete días postinoculación para titularse por la técnica de hemoaglutinación. Se le dieron dos pases más y nuevamente se titularon. Los resultados mostraron que en los animales inoculados con el VEOA se logró aislar este virus.

4.2.6.2. Detección del virus vacunal de la FPC

Técnica de ELISA

Las ocho muestras de suero obtenidas de cada uno de los doce animales, se trabajaron para la detección viral del VFPC. Los cerdos del grupo control resultaron negativos a la presencia del virus de la FPC.

Los cerdos del grupo inoculado con el VEOA resultaron negativos a la presencia del virus de la FPC.

Los cerdos del grupo vacunado contra FPC, así como los del grupo con doble tratamiento (inoculados con el VEOA e inmunizados con la vacuna PAV 250) resultaron positivos a la presencia del virus de FPC a partir del quinto día postvacunación y hasta el fin de la investigación, a los 17 días.

4.2.7. Subpoblaciones de linfocitos en la sangre periférica

La identificación de las poblaciones celulares se realizó por citometría de flujo, utilizando anticuerpos monoclonales contra $CD4^+CD8^-$, $CD8^+CD4^-$, $CD4^+CD8^+$, $CD4^-CD8^-$. Una vez obtenidos los porcentajes de las células evaluadas, de los cuatro tratamientos, en los diferentes tiempos se calculó la estadística descriptiva de las variables bajo estudio, para la población en general y para cada uno de los tratamientos en todas las etapas de la fase experimental (cuadros 22,23,24,25,26 anexo).

Posteriormente, se realizaron análisis de varianza comparando las subpoblaciones linfocitarias de los cuatro grupos tratamientos encontrándose diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) en las 4 subpoblaciones de linfocitos. Para los linfocitos $CD4^+CD8^-$, $CD4^-CD8^+$, $CD4^-CD8^-$ las diferencias fueron atribuidas al tratamiento entre los grupos. Los linfocitos $CD4^+CD8^+$ fueron estadísticamente diferentes en el tiempo de la fase experimental (cuadros 9,10,11,12 anexo).

En el Grupo 1 (vacunado contra la FPC) se encontraron diferencias estadísticas en los linfocitos $CD4^-CD8^+$ y $CD4^-CD8^-$ ($p < 0.007$ y $p < 0.05$ respectivamente, en ambas poblaciones existió un incremento en el porcentaje de ellas, a partir del 5 día postvacunación y hasta el final de la fase experimental. Para la población $CD4^-CD8^+$ el incremento del porcentaje inició el

día 5 con 14.92% llegando a un máximo de 43% en el día 17. En los linfocitos CD4⁻CD8⁻ el aumento fue de 58.27% (Figuras 9 y 10).

En el Grupo 2 (vacunado contra la FPC e inoculado con el VEOA), sólo la población de linfocitos CD4⁺CD8⁻ tuvo diferencias ($p < 0.04$), manifestadas en una disminución del 28.8 % de ellas, a partir del 8 día del estudio (Figura 8).

En el Grupo 3 (inoculado con el VEOA) las diferencias estadísticas fueron en las poblaciones linfocitarias CD4⁺CD8⁻ y CD4⁻CD8⁺ ($p < 0.01$ y $p < 0.03$ respectivamente), la primera población disminuyó un 9.19% a partir del día 4 y hasta el final de la investigación. La población CD4⁻CD8⁺ aumento el día 6 un 20.45% (Figura 8 y 9).

Los incrementos y disminuciones se dan con respecto al grupo testigo.

5. DISCUSIÓN

5.1. ETAPA I

El sistema inmune porcino es el único de los animales domésticos en el que la expresión de los linfocitos CD4 y CD8, definen cuatro subpoblaciones extra tónicas ($CD4^+CD8^-$, $CD4^-CD8^+$, $CD4^+CD8^+$, $CD4^-CD8^-$)⁴⁴⁻⁴⁸ En la primera etapa del estudio, se cuantificaron las cuatro subpoblaciones de linfocitos en la sangre periférica del cerdo Pelón Mexicano sano de dos meses de edad usando la técnica de citometría de flujo.

Estudios previos en el cerdo convencional revelan marcadas diferencias en el fenotipo de los linfocitos T al compararlos con los de otras especies, en particular la existencia de concentraciones relativamente altas de $CD4^+CD8^+$, subpoblación que puede ser caracterizada morfológica y fenotípicamente como linfocitos T maduros.⁴⁷⁻⁴⁸

En el humano, menos de un 3% de las células T expresan marca doble positiva ($CD4^+CD8^+$); en el cerdo esta población puede ser mayor de 10 y hasta un 60% en la sangre periférica, con el incremento gradual en proporción con la edad según lo expresa Zuckermann et al, 1996, La cuantificación de esta subpoblación sanguínea en el cerdo Pelón Mexicano en este estudio, reveló un 7.7% que concuerda con lo encontrado por Zuckermann en cerdos de la raza york-landrace, y que afirma que la subpoblación de linfocitos $CD4^+CD8^+$ representa menos del 2% del total de linfocitos, a la semana de edad. Entre el 4-6% en el primer mes de edad. Del 5 al 7 % entre los 2 y 3 meses de edad. De acuerdo a este estudio no hay diferencias en esta población linfocitaria entre cerdos de la raza york-landrace y los cerdos Pelón Mexicano.

La subpoblación de linfocitos $CD4^+CD8^-$ en el cerdo Pelón Mexicano de dos meses de edad, tuvo porcentajes con una media de 28.72 y con desviación estándar de 8.62, datos que son similares y concuerdan con lo escrito por Saalmüller et al 1987 y Zuckermann et al 1996, quienes reportan valores a los dos meses de edad de 20.1 a 26.3% para cerdos York x Duroc x Landrace.

Para Saalmüller, Zuckermann y Joling los porcentajes de la población $CD4^-CD8^+$ en la sangre periférica de cerdos de la raza York-Landrace de 2 a 3 meses de edad, los reportan con rangos que van de 22.6 a 28%,⁵³ valores que difieren con los encontrados en este estudio, donde se observó que el cerdo Pelón Mexicano posee un número más alto de células con este fenotipo, alcanzando porcentajes con media de 37.05 y desviación estándar de 8.7. Siendo esta una población con funciones citotóxicas, es probable que esta condición le sea favorable al animal ante infecciones virales.

Binns 1994, reportan en cerdos jóvenes un alto porcentaje de células linfoides en la sangre, timodependientes llamadas "nulas" o células T $\gamma\delta$, las cuales expresan proteínas de superficie asociadas a la presentación de antígenos solubles vía moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II, fenotípicamente son $CD2^-$, $CD4^-$ $CD8^-$, por lo que son células $CD4^-CD8^-$. En este estudio se evidenció y cuantificó esta subpoblación encontrándose valores promedio de 16.14 %.⁵⁰⁻⁵²

Los resultados de este estudio muestran que en el cerdo pelón mexicano se evidencian los cuatro tipos de las subpoblaciones linfocitarias sanguíneas ($CD4^+, CD8^-$, $CD4^-CD8^+$, $CD4^+CD8^+$, $CD4^-CD8^-$), al igual que en el cerdo convencional y con porcentajes similares para la edad, en casi todos los fenotipos. Las células linfocitarias con fenotipo $CD4^-CD8^+$ en la sangre periférica tienden a tener valores más altos que los que se obtienen de cerdos de la raza York-Landrace.

5.2 ETAPA II

Para esta investigación, se utilizó un aislamiento de campo. Este virus ha sido caracterizado y se denominó PAC-3. El virus fue aislado en el estado de Jalisco en el año de 1990. En dicha región existen varias enfermedades que generan signos clínicos similares a los de la enfermedad del ojo azul. De este aislamiento se pudo determinar que es un virus que produce efecto citopático en células PK-15 y Vero. Al confrontar al aislamiento viral con eritrocitos de ave, bovino y cuye, se observó hemaglutinación y hemadsorción. Estas

reacciones no se presentan con el virus de la enfermedad de aujeszky ni con el virus de la fiebre porcina clásica, ambos virus no tienen la capacidad de aglutinar eritrocitos. La caracterización se realizó con pruebas como la de electroforesis, microscopia electrónica, inmunofluorescencia, hemaglutinación, hemadsorción y efecto citopático. Este aislamiento ha sido caracterizado y el virus es capaz de generar signos nerviosos en animales lactantes, así como el generar orquitis en verracos e infectar fetos de cerdas, durante la gestación.⁵⁴

El diseño experimental fue planteado con tres tratamientos diferentes: animales vacunados contra la fiebre porcina clásica con la cepa PAV 250, animales vacunados con la vacuna PAV 250 e inoculados con el VEOA y animales inoculados con el VEOA, para evaluar el efecto de la vacuna y del virus en la respuesta inmune celular.

Sánchez Vizcaíno 2002, en su curso de enfermedades infecciosas porcinas, menciona que los animales afectados con cepas de alta virulencia de fiebre porcina clásica, provocan que los cerdos tengan fiebre de 41° C, apatía o baja actividad, disminución del apetito, adelgazamiento y embotamiento, los animales se hacinan y aparecen temblores, conjuntivitis con marcada descarga ocular, descarga nasal, estreñimiento, que evoluciona a diarrea color gris amarillento y puede haber vómitos con un alto contenido de bilis (color amarillo-verdoso).

La vacunación contra la fiebre porcina clásica se inicia en 1905 cuando Dorset y colaboradores, en Ames, Iowa, Estados Unidos, usaron un método descrito por Kolle y Turner para combatir la peste bovina en 1898. El método consistía en aplicar de manera simultánea el virus, sangre desfibrinada colectada de un cerdo infectado, en fase aguda y suero de cerdo recuperado. Sus experimentos mostraron que el suero hiperinmune, administrado simultáneamente con sangre infectada con el virus de la fiebre porcina clásica, da por resultado una inmunidad duradera. Posteriormente se investigó las vacunas atenuadas. Muchos laboratorios ofrecían a la venta vacunas de cepas atenuadas que se aplicaban simultáneamente con suero hiperinmune y lo que realmente sucedía era la venta de cepas de mediana o alta virulencia. Se

realizaban algunos pases celulares a estas cepas y después se vendían como cepas supuestamente atenuadas. Esta situación ocasionaba que en ocasiones se presentaran brotes de la enfermedad, después de vacunar. Este procedimiento de vacunación se utilizó en México hasta el año de 1983.⁵⁹

A partir de este momento se les exige a los laboratorios que las vacunas sean realmente atenuadas. Los puntos más relevantes que se les exigieron a estas vacunas fueron los siguientes. Una prueba de potencia (protección a por lo menos el 80% de los animales), inocuidad, esterilidad y sobre todo que no revertieran a cepa de alta virulencia, después de recibir pases seriados. Después de 1983 en México desaparecieron los sueros hiperinmunes y las vacunas inactivadas. Sólo permanecieron las siguientes cepas; Minnesota, GPE⁻, China, PAV 1 y PAV-250. A partir de 1998, la Dirección General de Sanidad Animal decidió utilizar sólo una vacuna, la PAV 250, para así poder tener un mejor control en la campaña contra la erradicación de esta enfermedad.¹⁰

La ausencia de signos clínicos en el grupo de cerdos Pelón Mexicano vacunados con la vacuna PAV 250, así como los parámetros normales en temperatura concuerda con los resultados encontrados por Correa 1998, acerca de la inocuidad de la vacuna PAV 250 en cerdos convencionales en los cuales se observa que después de aplicar una dosis de esta vacuna, en los cerdos vacunados, no hay hipertermia, leucopenia ni se presentan signos clínicos a causa de la vacunación.¹⁰

En la enfermedad del ojo azul es factible poder detectar signos clínicos en las diversas etapas de la línea de producción como: signos nerviosos en los lechones, orquitis en verracos, mortinatos y momificaciones en el parto y en algunas ocasiones opacidad corneal.⁵⁴ Las moléculas de ácido neuramínico juegan un papel primordial en el tropismo tisular manifestado por el *Rubulavirus porcino*, ya que se identificó una correlación directa entre la expresión de Neu5Ac±2,3 Gal en un tejido sano y la detección de antígeno viral en los animales.⁶⁰ En el sistema nervioso central (SNC) de los cerdos neonatos, la mayor expresión de Neu5Ac±2,3 Gal se localizó en cerebelo, médula oblonga

y tálamo, así como en las estructuras involucradas en la conducción del estímulo. En contraste se observó que estas mismas estructuras de SNC de los cerdos adultos, casi no poseen Neu5Ac±2,3 Gal y en cambio expresan abundantemente su isómero Neu5Ac±2,6 Gal, aumentando la expresión de ácidos sialicos 9-0 acetilados. Al analizar los cortes histológicos del sistema reproductor ,se encontró que los residuos de Neu5Ac±2,3 Gal son más abundantes en los testículos y epidídimo de cerdos los adultos, que en cerdos los neonatos.^{60,61} Estos resultados indican que el tropismo celular y la susceptibilidad a la infección viral son determinados por la expresión de Neu5Ac±2,3 Gal en un tejido. En los animales destetados, con edades iguales a los cerdos Pelones de este estudio; los receptores al virus en encéfalo tienden a disminuir, de ahí que no se observen signos clínicos nerviosos. A pesar de que el receptor del virus en sistema nervioso central disminuye con la edad, se ha observado que el receptor esta presente en pulmón tanto en animales lactantes como en animales adultos.⁵⁸⁻⁶¹

Los resultados de este estudio muestran que dada la edad de los animales utilizados en el estudio y lo descrito por los autores referente a los receptores virales, no se observaron signos clínicos evidentes causados por el VEOA, tanto en el grupo que sólo recibió el virus de la enfermedad del ojo azul como en el grupo que recibió doble tratamiento (inoculación con el VEOA y vacuna PAV 250), salvo la apatía y anorexia que presentaron el día 1 y 2 postinoculación como consecuencia del aumento de temperatura en esos días.

En algunas enfermedades virales del cerdo las biometrías hemáticas son pruebas complementarias para el diagnóstico. Se utilizan con mayor frecuencia para el diagnóstico diferencial en la peste porcina africana, donde provoca leucopenia. En la etapa febril de la fiebre porcina clásica se observa anemia, trombocitopenia y leucopenia. Desciende la cuenta leucocitaria de 9000 a 3000 por mm³, la cual persiste hasta la muerte. Las plaquetas tienen como valores normales de 150 000 a 500 000 por mm³ y disminuyen de 50 000 a 5 000 por

mm³. También se logra observar ligera leucopenia en otras enfermedades que afectan al cerdo; por ejemplo: diarrea viral bovina.⁶²

En este estudio se hizo un seguimiento cronológico de las biometrías hemáticas de todos los animales que se vacunaron con la PAV 250, con la finalidad de detectar cambios que pudiera generar algún tipo de infección. Los cambios no se presentaron en ninguno de los tipos de células reportadas en este estudio, para ninguno de los animales.

El *Rubulavirus porcino* ingresa por vía oronasal, se aloja en tonsilas y se distribuye en el resto del organismo vía linfática, posteriormente vía arterial y venosa. La distribución del virus vía sanguínea quedó demostrada en el trabajo realizado por Hernández J, et al 1998, en el cual todos los cerdos infectados con el virus de la enfermedad del ojo azul, fueron identificados con el antígeno viral a partir del día 4 post infección en sangre. Sin embargo en los valores hemáticos no se observan cambios relacionados con la infección viral.⁶¹

En este trabajo las biometrías de los animales inoculados con el *Rubulavirus porcino* y los que recibieron a este virus y la vacuna PAV 250 tampoco generaron ningún tipo de alteración en los parámetros normales, lo que indica la no-afinidad del virus hacia los diferentes componentes sanguíneos.

La respuesta serológica a la vacunación contra FPC se evalúa con relación a la edad de los cerdos y la curva de desaparición de los anticuerpos maternos, esto con el fin de obtener la inmunidad óptima. Corona demuestra que a la edad de 8 semanas, los cerdos tienen una protección del 100%. En las pruebas de potencia oficiales realizadas a la vacuna, se exige que cada lote probado de vacunas comerciales, confiera un mínimo del 80% de protección, ante una dosis de desafío que mate por lo menos al 80% de los cerdos controles. De modo que cada lote tiene la garantía de haber sido probado y que pasó satisfactoriamente las pruebas de inocuidad, potencia y no diseminación. Se ha demostrado que la vacuna PAV250 confiere protección entre el tercer y quinto días posteriores a su aplicación.^{64,10}

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la vacuna PAV 250 en el cerdo Pelón Mexicano únicamente vacunado con ella, genera anticuerpos desde el 5° día postvacunación. En los cerdos que recibieron la vacuna y el inóculo de *Rubulavirus porcino* los anticuerpos se detectaron en el 100% de ellos hasta el día 10 postvacunación, considerándola así altamente inmunogénica. Los resultados de este estudio difieren de lo encontrado por Piriou et al 2003, quien reporta haber encontrado anticuerpos en animales vacunados con FPC a partir del 10 postvacunación por la técnica de RT PCR.

La literatura indica que la respuesta humoral contra el *Rubulavirus porcino* se inicia con anticuerpos específicos identificados desde la primera semana posinfección (PI). Durante las primeras cuatro semanas PI los títulos fluctúan entre 4 y 6 log₂, a partir de la quinta semana PI los títulos se incrementan, llegando hasta 8.5 log₂. En infecciones naturales, los anticuerpos se pueden detectar hasta después de 18 meses de la infección.⁶² Ensayos *in vitro* demuestran que los anticuerpos específicos contra el *Rubulavirus porcino* o contra péptidos inmunogénicos, tienen actividad neutralizante.⁶¹ Los anticuerpos inhiben la unión del virus a su receptor celular, favorecen la destrucción viral por complemento y llevan a cabo otros mecanismos de neutralización.

En este estudio se observó una mejor respuesta serológica contra el virus de la enfermedad del ojo azul en el grupo que sólo recibió a este virus. El grupo que se desafió con este virus y que se le aplicó la vacunación contra la fiebre porcina clásica, tuvo una respuesta mas tardía y con menor título. Aunque se observa esta diferencia, es muy factible que se trate de una respuesta individual de los animales.

Los estudios realizados en cerdos infectados con el virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo del Cerdo (PRRS), con el virus de la fiebre porcina africana y con el virus de la enfermedad de aujeszky han mostrado los cambios en las poblaciones celulares de la sangre periférica debido a la infección; los resultados de estos estudios revelaron una disminución en los porcentajes de linfocitos CD4 y aumento en los linfocitos CD8. Los autores sugieren que en la

infección aguda la actividad citotóxica de los linfocitos CD4⁺CD8⁺ no requieren la participación de los linfocitos cooperadores.

Las células T ejercen diversas funciones en la inmunidad frente a los virus. La mayoría de las respuestas son timo dependientes y precisan la colaboración de las células T CD4 para que proporcionen los estímulos necesarios para la proliferación, diferenciación y maduración de los linfocitos B. Las células T CD4 también intervienen en la activación de las células T citotóxicas CD8, así como en la acumulación y activación de los macrófagos en las zonas de infección vírica.

Las células T citotóxicas CD8⁺ se concentran en las zonas en que existe replicación vírica y destruyen a las células infectadas. Por otra parte se ha demostrado que los linfocitos CD4⁺, estimulados por cualquier virus, se transforman en linfocitos CD4⁺CD8⁺. Saalmüller et al 1987 y Pescovitz et al 1985, fueron los primeros en identificar la presencia de linfocitos CD4⁺CD8⁺ en el cerdo y en proponer dos hipótesis de sus posibles actividades biológicas, la primera: estas células pueden representar linfocitos inmaduros que emigraron del timo sin perder alguno de sus marcadores, y la segunda: estas células representan linfocitos CD4 que han adquirido el marcador CD8 después de su sensibilización y lo retienen para convertirse en linfocitos pequeños. La primera hipótesis fue rechazada, ya que estos linfocitos no expresan el marcador CD1 que identifica a los timocitos; la segunda hipótesis es la más aceptada. Los resultados indican que los linfocitos CD4⁺CD8⁻, adquieren el marcador CD8⁺ para convertirse en linfocitos CD4⁺CD8⁺ después de estimular células *in vitro* en presencia de virus, bacterias o parásitos. Estos resultados sugirieron que actúan con restricción por el MCH II; es decir, que la molécula funcional es el CD4.⁶² La subpoblación CD4⁺CD8⁺ se encuentra normalmente en sangre periférica, en nódulos linfáticos y aumentan en número conforme la edad del cerdo. Estudios realizados por Hernández et al 2001, demuestran que esta población de linfocitos T responden de manera específica al virus para convertirse en células de memoria productoras de citocina tipo 2, las cuales inducen una respuesta inmune mediada por anticuerpos.

Los cambios en las poblaciones celulares durante la infección del *Rubulavirus porcino*, en el cerdo convencional, son similares a los de otras infecciones virales del cerdo; en las cuales se presenta un aumento de linfocitos T citotóxicos (CD8⁺) en la primera semana PI, y una notable reducción en el número de linfocitos CD4 que ocurre desde la primera semana postinfección.⁶² Este fenómeno según Reyes et al., 2002 puede estar relacionado con dos eventos: por un lado que la células sean dirigidas a los tejidos infectados para el control de la infección; y/o que los linfocitos CD4⁺CD8⁻ estimulados por el virus se transforman en linfocitos CD4⁺CD8⁺.^{61,62}

Las alteraciones en las subpoblaciones linfocitarias de la sangre periférica, durante la infección del virus de fiebre porcina clásica, cambian debido a que se trata de un virus inmunosupresor. Lee WC et al 1999 encontró un significativo incremento de 150-230% en monocitos, disminución en el número de IgM, así como en el número de linfocitos CD4⁺CD8⁻, todo esto en los 5 días posteriores a la inoculación. En los linfocitos con fenotipo CD4⁻CD8⁺ no se registró ningún cambio.⁶⁴ Pauly T, et al 1998 encontraron, una depleción de CD4-CD8- entre los días 14-19 posteriores a la infección con FPC.⁷⁰ Markowska y Pejeak 1999, reportan que en cerdos infectados con el virus de fiebre porcina clásica observaron un incremento en el porcentaje de CD4⁺CD8⁻ y un dramático descenso de CD4⁻CD8⁺. Cuando se trata de un virus vacunal atenuado los resultados difieren, en la investigación realizada por Terzic et al 2003, en donde evalúa la proporción de la expresión fenotípica de los linfocitos sanguíneos de cerdos vacunados con una vacuna atenuada y una subunitaria, en contra de fiebre porcina clásica, reportan un incremento de la población CD4⁺CD8⁻ entre los días 24 y 48 postvacunación, y de CD4⁻CD8⁺. para ambas vacunas se registró un decremento del porcentaje el día 4 y 21 postvacunación.^{72,73}

En este estudio los cerdos Pelón Mexicanos inoculados con el *Rubulavirus porcino* del Grupo 3 y los animales del Grupo 2 (inoculado con el VEOA y vacunado con la vacuna PAV 250) presentaron una disminución de linfocitos CD4⁺CD8⁺ a partir de la primera semana, alteración que concuerda

con lo reportado en estudios previos, con cerdos de líneas comerciales infectados con este virus. Esta disminución probablemente responde a un secuestro de esta población en los tejidos para controlar la infección y por otra parte a un cambio de fenotipo a linfocitos $CD4^+CD8^+$. Población que sufre un aumento en el día 5 postinfección, relacionándose directamente con la disminución en ese mismo día del 9% de linfocitos $CD4^+CD8^+$. Esta misma situación se debería esperar en las población $CD4^+CD8^+$ de los animales con el virus vacunal, por ser un virus activo; sin embargo, esta subpoblación no tiene ninguna diferencia estadística. Tampoco concuerda con el incremento en la proporción fenotípica reportada en animales vacunados con un virus atenuado muy probablemente por el tiempo que duro la investigación. La depleción que se observó en la población $CD4^+CD8^+$ de los animales de Grupo 2 es atribuida directamente a la participación del *Rubulavirus porcino*.

En los animales de los dos grupos que recibieron la PAV-250 no se observó la depleción marcada de linfocitos B, de linfocitos T $CD4^+CD8^-$, $CD4^-CD8^+$, y $CD4^-CD8^-$, ni la leucopenia que se reporta en cerdos infectados con el virus de campo de fiebre porcina clásica. Resultado que indica que aún siendo un virus de baja virulencia, no está generando la inmunosupresión conocida del virus de campo. El incremento de la población $CD4^-CD8^+$ en cerdos que sólo recibieron la vacunación nos indica una respuesta inmune eficaz en contra del virus vacunal. El incremento de la subpoblación $CD4^-CD8^-$ es un hallazgo relevante, pues se trata de una población que expresa proteínas de superficie, asociadas a la presentación de antígenos solubles vía moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II. En los cerdos del Grupo dos, que recibieron la vacuna y el VEOA no se generó ningún cambio en estas subpoblaciones. Es muy posible que la respuesta en estos animales sea más tardada, debido a que sólo se evaluó la fase aguda de la infección y no se detectaron los cambios, esta posibilidad se genera de los resultados de la respuesta humoral, donde para ambos virus la respuesta fue más tardada que en el caso de los cerdos que sólo tuvieron un tratamiento.

6. CONCLUSIONES

1.- Primer trabajo que evidencia y cuantifica las subpoblaciones linfocitarias $CD4^+CD8^-$, $CD4^-CD8^+$, $CD4^+CD8^+$, $CD4^-CD8^-$ en el cerdo Pelón Mexicano sano, encontrándose que la subpoblación $CD4^-CD8^+$ tuvo valores superiores a los reportados en la bibliografía en cerdos de líneas comerciales, de esta edad.

2.- En el análisis de las subpoblaciones $CD4^+CD8^-$, $CD4^-CD8^+$, $CD4^+CD8^+$, $CD4^-CD8^-$ de la sangre periférica de animales vacunados con la cepa PAV-250 se identificó un incremento en el porcentaje de linfocitos sanguíneos fenotipo $CD4^-CD8^+$, $CD4^-CD8^-$ en la primera semana postvacunación.

3.- En cuanto a subpoblaciones linfocitarias de la sangre periférica se refiere, que el virus vacunal cepa PAV 250 contra la fiebre porcina clásica, no generó las mismas alteraciones que produce el virus de alta virulencia de esta misma enfermedad.

4.- En cerdos Pelón Mexicano desafiados con el virus de la enfermedad del ojo azul, el comportamiento de las subpoblaciones de la sangre periférica $CD4^+CD8^-$, $CD4^-CD8^+$, $CD4^+CD8^+$, $CD4^-CD8^-$ fue idéntico al reportado en cerdos de líneas comerciales. Los porcentajes de linfocitos $CD4^+CD8^-$ disminuyeron durante la primera semana postinoculación y los $CD4^-CD8^+$ aumentaron también en la primera semana.

5.- En los animales vacunados con la PAV 250 e inoculados posteriormente con el virus de la enfermedad del ojo azul, las alteraciones en las subpoblaciones linfocitarias, sólo se observaron en $CD4^+CD8^-$. Se observó un decremento en la primera semana postinoculación. Efecto determinado por el virus de la

enfermedad del ojo azul y no por la vacuna. La respuesta humoral en estos animales fue más tardía que en los que sólo recibieron un tratamiento.

7. REFERENCIAS

- 1- Pérez ER. Aspectos de la porcicultura en México. *Síntesis Porcina* 1985;(1):50-45 y158-181.
- 2- López MJ, et al. *El Cerdo Pelón Mexicano*. Primera edición. Ciencia y Cultura Latinoamérica, México 1999.
- 3- Salinas RG. Caracterización del cerdo pelón mexicano: estudio recapitulativo (tesis de licenciatura) Distrito Federal México: Universidad Nacional Autónoma de México,1996.
- 4- Solís SS. Evolución de la “Campaña de control y erradicación de la FPC en México” Simposio internacional “La fiebre porcina clásica en las Américas” Editados por Morilla A. Puebla, México 1998: 185-191.
- 5- Van Oirschot JT. *Classical Swine Fever*. Diseases of Swine 8th Edition. Edited by Leman, Iowa State University, 1999: 274-292.
- 6- Carbajal VM. Presentación clínica de la fiebre porcina clásica. . Simposio internacional “La fiebre porcina clásica en las Américas” Editados por Morilla A. Puebla, México 1998: 163-184.
- 7- Morilla GA, et al. *Trends in emerging viral infections of swine*. Iowa State Press 2001:143-165.
- 8- Steven E. *Survival and inactivation of classical swine fever virus*. Vet Microbiol 2000; 73: 175-181.
- 9- González SC, et al. *Virus de la Fiebre Porcina Clásica reto a la Medicina Veterinaria*. Memorias del XXXIV Congreso de la Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos. (AMVEC); Mérida (Yucatán) México 1999.
- 10-Correa GP. Características más importantes de la vacuna PAV 250 y de las vacunas contra Fiebre porcina clásica usadas en México. Simposio internacional “La fiebre porcina clásica en las Américas”. Editados por Morilla A. Puebla (Puebla) México 1998: 301-324.

- 11-Fuentes M, Carreón R, Stephano A y Ramírez H. Estudios preliminares del paramixovirus del ojo azul en la Republica Mexicana. En: Doporto J y Perez F. Memorias del curso de actualización de las enfermedades del cerdo. México 1989:78-82.
- 12-Stephano HA, Gay GM. El síndrome del la enfermedad del ojo azul en cerdos. Avances en las enfermedades del cerdo, estudio experimental. Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. México (DF) 1983;523-526.
- 13-Stephano HA, Gay GM, Ramírez TC, Maqueda AJJ. Estudio de un brote de encefalitis en lechones por un virus hemaglutinante. Memorias del XVII Congreso de la Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos. (AMVEC); Ixtapa Zihuatanejo (Guerrero) México 1981.
- 14-Stephano HA, Gay GM. El Síndrome del la enfermedad del ojo azul en granjas engordadoras. Memorias del XIX Congreso de la Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos. (AMVEC). Mérida (Yucatán) México 1985: 71-74.
- 15-Stephano AH. Encefalitis y opacidad de la córnea en cerdos destetados, inoculados experimentalmente con paramyxovirus de la enfermedad del ojo azul Memorias del XXIII Congreso de la Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos. (AMVEC). León (Guanajuato) México 1988: 90-92.
- 16-Lamb, RA. Paramyxoviridae: The viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe D.M. et al. Virology. Tercera Ed. Lippincott-Raven Publishers, 1996: 1177-1204.
- 17-Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL. Virus Taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Vienna, New York: Springer-Verlag, 1995:265-27.
- 18-Linné T, Berg M. Moreno LJ. The molecular biology of the porcine paramixovirus LPMV. Vet Microbiol 1992;33:263-273.
- 19-Kingsbury WD, *Paramyxoviridae and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, et al. (Eds.) Virology, 2nd ed. Raven Press. New York 1990:945-961.*

- 20-Stephano HA. El Síndrome de la enfermedad del ojo azul en cerdos .
Síntesis Porcina 1985;4(5):42-49.
- 21-Stephano AH, Doperto JM, and Gay M. Estudio epidemiológico en dos
granjas afectada por el la enfermedad del ojo azul. Proc. Int Congr Pig
Vet Soc 1986; (9):456.
- 22-Stephano AH; Gay GM. Properties of a paramixovirus associated to a
new syndrome (blue eyes) characterized by encephalitis, reproductive
failure and corneal opacity. Proc. Int Congr Pig Vet Soc 1986; (9):455.
- 23-Stephano HA, Gay GM. El síndrome de la enfermedad del ojo azul. Una
nueva enfermedad en cerdos asociados a un paramixovirus. Veterinaria
México 1986;17:120-122 .
- 24-Stephano AH et al. La enfermedad del la enfermedad del ojo azul.
Signos Clínicos y lesiones. Memorias de Simposium Internacional sobre
Enfermedades Emergentes del Cerdo; Irapuato (Guanajuato). México
2000:1-10.
- 25-Pérez F, Stephano A, Gay M. Estudio histológico en lechones inoculados
experimentalmente con el paramixovirus de la enfermedad del ojo azul.
Memorias del XXIII Congreso de la Asociación de Médicos Veterinarios
Especialistas en Cerdos. León (Guanajuato) México 1988: 81-83.
- 26-Vizuet AOT Aislamiento del paramixovirus del ojo azul a los 5, 10, 20,
30, y 45 días, a partir de una inoculación experimental en cerdos adultos
de la raza Pelón Mexicano. Tesis de Licenciatura, Facultad de medicina
Veterinaria y Zootecnia, UNAM. México (DF) 1995.
- 27-Abbas KA, et al. Inmunología celular y molecular. *Cuarta* edición. Mc
Graw Hill, 2002.
- 28-Tizard RI. Inmunología Veterinaria. Sexta edición . Mc Graw Hill, 2000.
- 29-Roitt I. *Inmunología. Cuarta edición*. Harcourt Brace,1997.
- 30-Saalmueller A. Jonjic S. and Koszinowski, UH. Simultaneous expression
of CD4 and CD8 antigens by a substantial proportion of resting porcine
T lymphocytes. Eur. J. Immunology, 1987; 17: 1297-1301.

- 31-Zuckermann FA and Husmann, RJ. Functional and phenotypic analysis of porcine peripheral blood CD4/CD8 double positive T cells. *Immunology* 1996;87: 500-512.
- 32-Pescovitz MD, Lunney JK & Sachs DH. Murine anti-swine T4 and T8 monoclonal antibodies: distribution and effects on proliferative and cytotoxic T cells. *J. Immunology* 1985; 134: 37-44.
- 33-Yang H and Parkhouse M. Phenotypic classification of porcine lymphocytes subpopulation in blood and lymphoid tissues. *Immunology* 1996; 89: 76-83.
- 34-Griffin D, Ward B, Esolen L. Pathogenesis of Measles virus infection: An hypothesis for altered immune responses. *J. Infect Dis* 1994;170(1):24-31.
- 35-Doherty P. Anatomical environment as a determinant in viral immunity. *J Immunol* 1995;155:1023-1027.
- 36-Murray N, Michael A. Antigen presentation in virus infection. *Curr Opin Immunol* 1992;4 :401-407.
- 37-Koszinowski U, Reddehase M, Jinjic S. The role of CD4 and CD8 cells in viral infections. *Curr Opin Immunol* 1991;3:471-475.
- 38-Schalm OW, Jain NC, Carroll EJ. *Veterinary hematology*. 3rd ed. Lea and Febiger. Philadelphia: USA, 1985.
- 39-Burlinson FG, Chambers TM, Wiedbrauk DL. *Virology a laboratory manual*. Academic Press, Inc.1992.
- 40-Freshney RI. *Culture of animal cells*. 3^{er} ed. Wiley-Liss. Inc. New York: U.S.A, 1994.
- 41-Ling NR, Catty D. Haemagglutination and hemolysis assays. Catty D, editors. *Antibodies*. IRL Press 1989; (1):169-188.
- 42-Gardner PS, Mc Quillen J. *Rapid virus diagnosis application of immunofluorescence*, Butter worth INC. Great Britain. 1980.
- 43-Harlow E, Lanne D. *Antibodies laboratory manual*. Cold Spring Harbor. NY U.S.A 1988.

- 44-Joling P, Kappe AL. Distribution of lymphocyte subpopulations in thymus, spleen and peripheral blood of specific pathogen pigs from 1 to 40 weeks of age. *Vet Immunol and Immunopathol* 1994;40:105-117.
- 45-Saalmüller A, Bryant J. Characteristics of porcine T Lymphocytes and T-cell lines. *Vet Immunol and Immunopathol* 1994;43:45-52.
- 46-Jonjic N, Saalmüller A. Distribution of T-lymphocyte subsets in porcine lymphoid tissues. *Immunology* 1987;60:395-401.
- 47-Zuckermann AF. Extrathymic CD4/CD8 double positive T cells. *Vet Immunol and Immunopathol* 1999;72:55-66.
- 48-Zuckermann AF. Distribution of porcine CD4/CD8 double positive T lymphocytes in mucosa-associated lymphoid tissues. *Immunology* 1996;87:493-499.
- 49-Zuckermann AF, et al. Functional and phenotypic analysis of porcine peripheral blood CD4/CD8 double positive T cells. *Immunology* 1996;87:500-512.
- 50-Pescovitz MD, Andreas G, Sakopoulos JA. Porcine peripheral blood CD4/CD8 dual expressing T- cells. *Vet Immunol and Immunopathol* 1994;43:53-62.
- 51-Davis WC, Haverson A, Saalmüller H, Yang JK. Analysis of monoclonal antibodies reacting with molecules expressed on T cells. *Vet Immunol and Immunopathol* 2001;80:53-62.
- 52-Saalmüller A, Werner H. Porcine γ/δ T lymphocyte subsets differing in their propensity to home to lymphoid tissue. *Eur. J. Immunol* 1990;20:2343-2346.
- 53-Binns RM. The Null/ γ/δ TCR+ T cell family in the pig. *Vet Immunol and Immunopathol* 1994;43:69-77.
- 54-Ramirez MH, Hernandez JP, et al. Lesions in the reproductive tract of boars experimentally infected with Porcine Rubulavirus. *J Comp. Path* 1997; 117:237-252.

- 55-Sánchez VJ, Romero AM, Gómez V. Curso digital de enfermedades infecciosas porcinas. Editor y coordinador Sánchez Vizcaíno J. Madrid España 2002.
- 56-Ramírez NR. Mi historia acerca del cólera porcino en México. Simposio Internacional "La fiebre porcina clásica en las Américas" Editados por Morilla A. Puebla (Puebla) México 1998:45-191.
- 57-Sthephano AH. Blue Eye disease. WL Mengeling , editor Chapter 6. Viral Diseases 1994:237-341.
- 58-Reyes LJ, Sanchez ME. Sistema olfatorio vía de ingreso del *Rubulavirus porcino* al sistema nervioso central . Distribución y papel de los ácidos siálicos.1997.
- 59-. Reyes LJ et al. Mecanismos Moleculares de la Patogenia Viral: Estudios con el *Rubulavirus porcino*. Mensaje Bioquímico, Vol XXVI . Depto. Bioquímica, Fac. De Medicina.UNAM. México (2002).
- 60- Calderon AN, Paasch ML. Estudios Hematológicos e histológicos de médula ósea de cerdos infectados experimentalmente con el virus de la fiebre porcina clásica. Memorias de XXXII Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de veterinarios especialistas en Cerdos;. Ixtapa Zihuatanejo (Guerrero) México, 1997.
- 61-Hernández J, Reyes LJ, Zenteno R, Ramírez H, Hernández JP, Zenteno E. Immunity to porcine rubulavirus infección in adult swine. Vet Immunol and Immunopathol 1998;64:367-381.
- 62-Hernández J, Garfias Y, Nieto A, Mercado C, Zenteno E. Comparative evaluation of the CD4+ CD8+ and CD4+ CD8- lymphocytes in the immune response to porcine rubulavirus. Vet Immunol and Immunopathol 2001;79:249-259.
- 63-Terzic S, Ballarin PA, Jemersic AL. Evaluation the protection of piglets originating from vaccinated sows after vaccination with classical swine fever virus strain china. Proceedings of the 15th IPVS. 5-9 july. Birmingham, England 1998.357.

- 64-Clavijo A, Min Lin. Application of competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the serologic diagnosis of classical swine fever virus infection. *J Vet Diagn Invest* 2001; 13: 357-360.
- 65-González SC et al. Virus de la fiebre porcina clásica reto a la medicina veterinaria. *Memorias de XXXIV Congreso nacional AMVEC; Mérida (Yucatán) México, 1999: 173-177.*
- 66-Smith JA. Laboratory diagnosis, epizootiology and efficacy of marker vaccines in classical swine fever: a review. *Vet Quart* 2000; 22: 182-188.
- 67-Lee WC, Wang CS, Chien MS. Virus antigen expression and alterations in peripheral blood mononuclear cell subpopulations after classical swine fever virus infection. *Vet Microbiol* 1999;67:17-29.
- 68-Summerfield A, McNeilly F, Walker I. Depletion of CD4+ and CD8 high+ T cells before the onset of viraemia classical swine fever. *Vet Immunol and Immunopathol* 2001;78:3-19.
- 69-Pauly T et al. Infection with classical swine fever virus: effects on phenotype and immune responsiveness of porcine T lymphocytes. *J Virol* 1998;79: 31-40.
- 70-Markowska-Daniel, Pejsak IZ. Phenotypic analysis of peripheral leucocytes in piglets infected with classical fever swine virus. *Res. Vet. Sci* 1999; 67:53-57.
- 71-Terzic S, et al. Proportions and Phenotypic Expression of peripheral blood leucocytes in pigs vaccinated with an attenuated C Strain and a Subunit E2 Vaccine against classical swine fever. *J Vet met .* 2003; 50: 166-171.
- 72-Piriou L, Chevallier S, Hutet E. Humoral and cell-mediated immune responses of d/d histocompatible pigs against classical swine fever (CSF) virus. *Vet Res* 2003; 34:389-404.
- 73-Terzic S, Comparison of antibody values in sera of pigs vaccinated with a subunit or an attenuated vaccine against classical swine fever. *Vet Res Comm* 2003; 27: 329-339.

8. ANEXO

Cuadro 4. Análisis de varianza de leucocitos durante la fase experimental, de los cuatro grupos.

Variable Dependiente					
Leucocitos					
FV	GL	SC Tipo III	CM	Valor de F	Pr > F
Tratamiento	3	42.70	14.23	1.48	0.05
Tiempo	4	93.89	23.47	2.43	
Error	52	501.50	9.64		
TOTAL	59	638.09			
R Cuadrada 0.214					

FV: Fuente de Variación

GL: Grados de libertad

SC: Suma de cuadrados

CM: Cuadrados medios

Cuadro 6. Análisis de varianza de linfocitos durante la fase experimental, de los cuatro grupos

Variable Dependiente					
Linfocitos					
FV	GL	SC Tipo III	CM	Valor de F	Pr > F
Tratamiento	3	127.93	42.64	7.86	0.00
Tiempo	4	42.70	10.67	1.97	0.11
Error	52	282.07	5.42		
TOTAL	59	452.70			
R Cuadrada 0.377					

FV: Fuente de Variación

GL: Grados de libertad

SC: Suma de cuadrados

CM: Cuadrados medios

Cuadro 9. Análisis de varianza de los linfocitos sanguíneos CD4+CD8-, de los cuatro grupos de cerdos.

Variable Dependiente CD4+CD8-					
FV	GL	SC Tipo III	CM	Valor de F	Pr > F
Tratamiento	3	470.10	156.70	4.63	0.01
Tiempo	6	345.53	57.59	1.70	0.13
Error	71	2401.25	33.82		
TOTAL	80	3223.94			
R Cuadrada 0.256					

FV: Fuente de Variación

GL: Grados de libertad

SC: Suma de cuadrados

CM: Cuadrados medios

Cuadro 10. Análisis de varianza de los linfocitos sanguíneos CD4-CD8+, de los cuatro grupos de cerdos.

Variable Dependiente CD4-CD8+					
FV	GL	SC Tipo III	CM	Valor de F	Pr > F
Tratamiento	3	970.49	323.50	9.09	<.0001
Tiempo	1	104.51	104.51	2.94	
Tiempo2	1	142.02	142.02	3.99	
Error	76	2704.81	35.59		
TOTAL	81	3907.38			
R Cuadrada 0.308					

FV: Fuente de Variación

GL: Grados de libertad

SC: Suma de cuadrados

CM: Cuadrados medios

Cuadro 11. Análisis de varianza de los linfocitos sanguíneos CD4+CD8+, de los cuatro grupos de cerdos.

Variable Dependiente CD4+CD8+					
FV	GL	SC Tipo III	CM	Valor de F	Pr > F
Tratamiento	3	20.22	6.74	1.19	0.32
Tiempo	6	217.08	36.18	6.41	<.0001
Error	71	400.97	5.65		
TOTAL	80	634.70			
R Cuadrada 0.368					

FV: Fuente de Variación

GL: Grados de libertad

SC: Suma de cuadrados

CM: Cuadrados medios

Cuadro12.Análisis de varianza de los linfocitos sanguíneos CD4-CD8-, de los cuatro grupos de cerdos.

Variable Dependiente CD4-CD8-					
FV	GL	SC Tipo III	CM	Valor de F	Pr > F
Tratamiento	3	2101.52	700.51	25.78	<.0001
Tiempo	6	133.34	22.22	0.82	0.56
Error	71	1929.43	27.18		
TOTAL	80	4213.43			
R Cuadrada 0.542					

FV: Fuente de Variación

GL: Grados de libertad

SC: Suma de cuadrados

CM: Cuadrados medios

Cuadro 13. Análisis de varianza de los linfocitos CD4-CD8+ en cerdos Pelón Mexicano vacunados con la vacuna contra la fiebre porcina clásica PAV 250.

Regresiones Tratamiento 1

Análisis de Varianza

Variable Dependiente CD4-CD8+					
FV	GL	SC	CM	Valor de F	Pr > F
Modelo	1	586.87	586.87	16.84	0.007
Error	18	627.38	34.85		
TOTAL	19	1214.26			
R Cuadrada 0.483					

FV: Fuente de Variación

GL: Grados de libertad

SC: Suma de cuadrados

CM: Cuadrados medios

Parámetros estimados

Variable Dependiente CD4-CD8+					
Variable	GL	PE	Error Estándar	Valor de t	Pr > t
Intercepto	1	-12.00	3.48	-3.45	0.003
Tiempo	1	2.64	0.64	4.10	0.00

PE:Parámetro estimado

Cuadro 14. Análisis de varianza de los linfocitos CD4-CD8- en cerdos Pelón Mexicano vacunados con la vacuna contra la fiebre porcina clásica PAV 250.

Análisis de Varianza

Variable Dependiente CD4-CD8-					
FV	GL	SC	CM	Valor de F	Pr > F
Modelo	1	160.85	160.85	4.33	0.05
Error	18	668.68	37.15		
TOTAL	19	829.53			
R Cuadrada 0.194					

FV: Fuente de Variación

GL: Grados de libertad

SC: Suma de cuadrados

CM: Cuadrados medios

Parámetros estimados

Variable Dependiente CD4-CD8-					
Variable	GL	PE	Error Estándar	Valor de t	Pr > t
Intercepto	1	2.41	3.59	0.67	0.51
Tiempo	1	1.38	0.67	2.08	0.05

PE:Parámetro estimado

Cuadro 15. Análisis de varianza de los linfocitos CD4+CD8- en cerdos Pelón Mexicano vacunados con la vacuna contra la fiebre porcina clásica PAV 250 e inoculados con el *Rubulavirus porcino*.

Regresiones. Tratamiento 2

Análisis de Varianza						
Variable Dependiente CD4+CD8-						
FV	GL	SC	CM	Valor de F	Pr > F	
Modelo	1	152.36	152.36	4.50	0.04	
Error	19	643.08	33.85			
TOTAL	20	795.44				
R Cuadrada 0.192						

FV: Fuente de Variación

GL: Grados de libertad

SC: Suma de cuadrados

CM: Cuadrados medios

Parámetros estimados						
Variable Dependiente CD4+CD8-						
Variable	GL	PE	Error Estándar	Valor de t	Pr > t	
Intercepto	1	0.70	3.42	0.21	0.84	
Tiempo	1	-1.35	0.63	-2.12	0.05	

PE:Parámetro estimado

Cuadro 16. Análisis de varianza de los linfocitos CD4+CD8- en cerdos Pelón Mexicano inoculados con el *Rubulavirus porcino*.

Regresiones. Tratamiento 3

Análisis de Varianza						
Variable Dependiente CD4+CD8-						
FV	GL	SC	CM	Valor de F	Pr > F	
Modelo	1	137.78	137.78	8.05	0.01	
Error	18	307.92	17.11			
TOTAL	19	445.70				
R Cuadrada 0.309						

FV: Fuente de Variación

GL: Grados de libertad

SC: Suma de cuadrados

CM: Cuadrados medios

Parámetros estimados						
Variable Dependiente CD4+CD8-						
Variable	GL	PE	Error Estándar	Valor de t	Pr > t	
Intercepto	1	3.68	2.43	1.51	0.15	
Tiempo	1	-1.29	0.45	-2.84	0.01	

PE:Parámetro estimado

Cuadro 17. Análisis de varianza de los linfocitos CD4-CD8+ en cerdos Pelón Mexicano inoculados con el *Rubulavirus porcino*.

Análisis de Varianza

Variable Dependiente CD4-CD8+					
FV	GL	SC	CM	Valor de F	Pr > F
Modelo	1	120.54	120.54	5.65	0.03
Error	18	383.84	21.32		
TOTAL	19	504.38			
R Cuadrada 0.239					

FV: Fuente de Variación

GL: Grados de libertad

SC: Suma de cuadrados

CM: Cuadrados medios

Parámetros estimados

Variable Dependiente CD4-CD8+					
Variable	GL	PE	Error Estándar	Valor de t	Pr > t
Intercepto	1	2.44	2.71	0.90	0.38
Tiempo	1	-1.21	0.51	-2.38	0.03

PE:Parámetro estimado

Cuadro 18. Biometrías hemáticas de cerdos vacunados con fpc. Grupo 1

Días de la investigación.	Hematocrito L/L	Hemoglobina g/L	Eritrocitos x 10 ¹² /l
0	0.53 (+/ 0.04)	113.5 (+/ 24.76)	6.10 (+/ 3.65)
1	0.49 (±0.05)	112 (±22.28)	6.00 (±2.83)
5	0.46 (±0.07)	121 (±27.10)	7.08 (±2.78)
8	0.45 (±0.07)	123 (±20.55)	6.65 (±1.93)
10	0.47 (±0.07)	119.5 (±12.06)	7.15 (±1.44)
12	0.48 (±0.06)	116.3 (±20.66)	7.38 (±0.95)
15	0.50 (±0.03)	115 (±19.92)	7.23 (±0.73)
17	0.49 (±0.05)	120.5 (±19.92)	7.98 (±0.37)

Valores medios ± desviación estándar.

Días de la investigación.	Neutrófilos x 10 ⁹ /L	Monocitos x 10 ⁹ /L	Eosinófilos x 10 ⁹ /L
0	8.70 (±1.3)	0.63 (+/ 0.32)	0.53 (+/ 0.00)
1	7.73 (±1.0)	0.63 (±0.51)	0.27 (±0.05)
5	9.50 (±0.56)	0.53 (±0.06)	0.10 (±0.07)
8	6.6 (±1.35)	0.50 (±0.10)	0.23 (±0.07)
10	7.87 (±4.63)	0.40 (±0.10)	0.15 (±0.07)
12	9.37 (±3.32)	0.55 (±0.03)	0.14 (±0.06)
15	8.9 (± 2.6)	0.45 (±0.02)	0.20 (±0.03)
17	9.95 (±1.89)	0.49 (±0.05)	0.24 (±0.05)

Valores medios ± desviación estándar.

Cuadro 19. Biometrías hemáticas de cerdos vacunados con fpc e inoculados con el virus de la enfermedad del ojo azul. Grupo 2

Días de la investigación.	Hematocrito L/L	Hemoglobina g/L	Eritrocitos x 10 ¹² /l
0	0.51 (±0.03)	149.33 (± 9.07)	7.33 (±0.29)
1	0.48 (±0.01)	149.33 (± 0.58)	7.47 (±0.45)
5	0.43 (±0.08)	142.33 (±11.68)	7.40 (±0.53)
8	0.49 (±0.02)	157.67 (± 1.53)	7.40 (±0.17)
10	0.45 (±0.06)	157.67 (±10.60)	8.37 (±0.98)
12	0.47 (±0.04)	151.67 (± 8.08)	7.47 (±0.65)
15	0.56 (±0.07)	150.67 (±6.66)	7.27 (±0.64)
17	0.48 (±0.02)	162.67 (± 4.62)	7.40 (±0.36)

Valores medios ± desviación estándar.

Días de la investigación.	Neutrófilos x 10 ⁹ /L	Monocitos x 10 ⁹ /L	Eosinófilos x 10 ⁹ /L
0	6.00 (±1.54)	0.20 (±0.03)	0.17 (±0.05)
1	5.30 (±2.46)	0.20 (±0.01)	0.27 (±0.38)
5	6.23 (±1.17)	0.27 (±0.06)	0.13 (±0.23)
8	8.20 (±1.37)	0.30 (±0.12)	0.03 (±0.15)
10	10.8 (±3.00)	0.24 (±0.12)	0.07 (±0.29)
12	9.20 (±4.20)	0.22 (±0.01)	0.08 (±0.10)
15	8.89 (±2.46)	0.12 (±0.10)	0.15 (±0.02)
17	9.3 (±3.42)	0.21 (±0.06)	0.19 (±0.00)

Valores medios ± desviación estándar.

Cuadro 20. Biometrías hemáticas de cerdos inoculados con el virus de la enfermedad del la enfermedad del ojo azul. Grupo 3

Días de la investigación.	Hematocrito L/L	Hemoglobina g/L	Eritrocitos x 10 ¹² /l
0	0.51 (±0.03)	160.33 (±4.62)	7.03 (±1.34)
1	0.48 (±0.01)	158 (±8.54)	7.60 (±0.17)
5	0.43 (±0.08)	148 (±10.82)	7.3 (±0.96)
8	0.49 (±0.02)	163 (±12.12)	7.93 (±0.83)
10	0.45 (±0.06)	168.33 (±10.69)	8.07 (±0.80)
12	0.47 (±0.04)	155.67 (±11.02)	7.43 (±0.38)
15	0.49 (±0.04)	158.67 (±11.85)	7.50 (±0.62)
17	0.49 (±0.02)	165.33 (±10.12)	7.80 (±0.36)

Valores medios ± desviación estándar.

Días de la investigación.	Neutrófilos x 10 ⁹ /L	Monocitos x 10 ⁹ /L	Eosinófilos x 10 ⁹ /L
0	4.92 (±0.82)	0.27 (±0.06)	0.17 (±0.06)
1	6.40 (±2.86)	0.05 (±0.07)	0.43 (±0.15)
5	6.10 (±1.90)	0.33 (±0.06)	0.01 (±0.01)
8	7.20 (±0.61)	0.20 (±0.17)	0.00 (±0.00)
10	7.71 (±0.95)	0.25 (±0.22)	0.20 (±0.20)
12	8.80 (±2.45)	0.18 (±0.21)	0.10 (±0.02)
15	7.90 (±1.07)	0.09 (±0.05)	0.08 (±0.04)
17	6.97 (±0.03)	0.15 (±0.13)	0.05 (±0.01)

Valores medios ± desviación estándar.

Cuadro 21. Biometrías hemáticas de cerdos testigo. Grupo 4

Días de la investigación.	Hematocrito L/L	Hemoglobina g/L	Eritrocitos x 10 ¹² /l
0	0.52 (±0.04)	141.67 (±10.26)	6.97 (±0.31)
1	0.48 (+/ 0.06)	143.33 (±12.42)	7.03 (±0.85)
5	0.47 (±0.01)	162.33 (±15.01)	7.53 (±0.65)
8	0.49 (±0.02)	165.00 (±4.58)	8.07 (±0.21)
10	0.42 (±0.05)	155.33 (±8.62)	7.63 (±0.21)
12	0.43 (±0.04)	162.67 (±8.5)	7.37 (±1.19)
15	0.56 (±0.02)	150.33 (±3.21)	7.50 (±0.70)
17	0.50 (±0.05)	156.00 (±4.00)	7.83 (±0.76)

Valores medios ± desviación estándar.

Días de la investigación.	Neutrófilos x 10 ⁹ /L	Monocitos x 10 ⁹ /L	Eosinófilos x 10 ⁹ /L
0	7.27 (±2.02)	0.17 (±0.29)	0.07 (±0.12)
1	6.17 (±2.17)	0.30 (±0.05)	0.03 (±0.06)
5	8.10 (±1.40)	0.47 (±0.08)	0.47 (±0.08)
8	5.57 (±2.29)	0.49 (±0.06)	0.37 (±0.02)
10	6.37 (±3.41)	0.13 (±0.81)	0.53 (±0.01)
12	5.73 (±2.50)	0.50 (±0.23)	0.42 (±0.15)
15	6.85 (±0.45)	0.29 (±0.36)	0.63 (±0.06)
17	7.93 (±1.98)	0.65 (±0.07)	0.56 (±0.32)

Valores medios ± desviación estándar.

Cuadro 22. Estadística descriptiva de las variables en estudio para los cuatro grupos de cerdos Pelón Mexicano.

Población total					
Variable	N	Promedio	Desviación Estándar	Mínimo	Máximo
Temperatura	96	38.67	0.38	38.00	39.80
CD4+CD8-	93	34.45	6.68	17.87	46.90
CD4-CD8+	94	34.26	6.65	21.03	58.45
CD4+CD8+	93	5.02	2.80	0.33	15.29
CD4-CD8-	93	17.70	5.85	5.40	35.21

Cuadro 23. Estadística descriptiva de las variables en estudio para los animales vacunados con la PAV 250.

Tratamiento 1 PAV 250					
Variable	N	Promedio	Desviación Estándar	Mínimo	Máximo
Temperatura	96	38.57	0.32	38.00	39.50
CD4+CD8-	93	32.45	7.34	17.87	45.56
CD4-CD8+	94	32.00	8.09	21.03	58.45
CD4+CD8+	93	3.52	1.31	1.01	6.44
CD4-CD8-	93	21.82	5.97	14.30	35.21

Cuadro 24. Estadística descriptiva de las variables en estudio para los animales vacunados con la PAV 250.e inoculados con el virus de la Enfermedad del la enfermedad del ojo azul.

Tratamiento 2 PAV 250 Y VEO					
Variable	N	Promedio	Desviación Estándar	Mínimo	Máximo
Temperatura	24	38.84	0.42	38.00	39.80
CD4+CD8-	24	33.42	6.22	22.80	42.21
CD4-CD8+	24	32.42	4.88	24.48	43.51
CD4+CD8+	24	4.71	3.16	0.33	10.91
CD4-CD8-	24	14.49	3.31	6.62	22.30

Cuadro 25. Estadística descriptiva de las variables en estudio para los animales inoculados con el virus de la Enfermedad del la enfermedad del ojo azul.

Tratamiento 3 VEOA					
Variable	N	Promedio	Desviación Estándar	Mínimo	Máximo
Temperatura	24	38.77	0.35	38.00	39.70
CD4+CD8-	24	34.55	6.85	23.29	46.38
CD4-CD8+	24	37.72	7.15	21.35	49.86
CD4+CD8+	24	6.07	3.48	1.01	15.29
CD4-CD8-	23	15.53	5.81	5.40	26.61

Cuadro 26. Estadística descriptiva de las variables en estudio para los animales testigo.

Tratamiento 4 TESTIGO					
Variable	N	Promedio	Desviación Estándar	Mínimo	Máximo
Temperatura	24	38.51	0.34	38.00	39.00
CD4+CD8-	22	37.56	5.48	26.48	46.90
CD4-CD8+	23	34.82	4.56	26.22	45.47
CD4+CD8+	22	5.79	1.97	1.78	9.89
CD4-CD8-	23	19.10	5.15	9.95	28.92

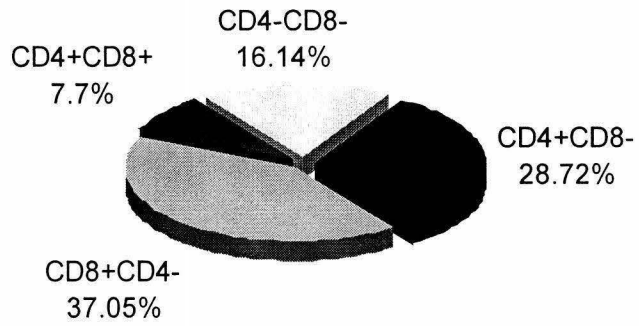


Figura 2. Porcentajes promedio de Subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica de cerdos Pelón Mexicano sanos.

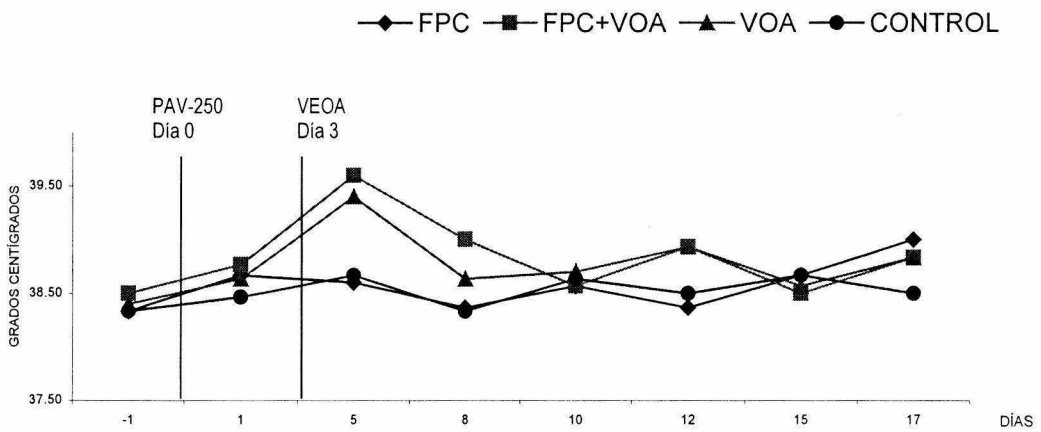


Figura 3. Temperaturas rectales promedio de los cerdos Pelón Mexicano durante la fase experimental.

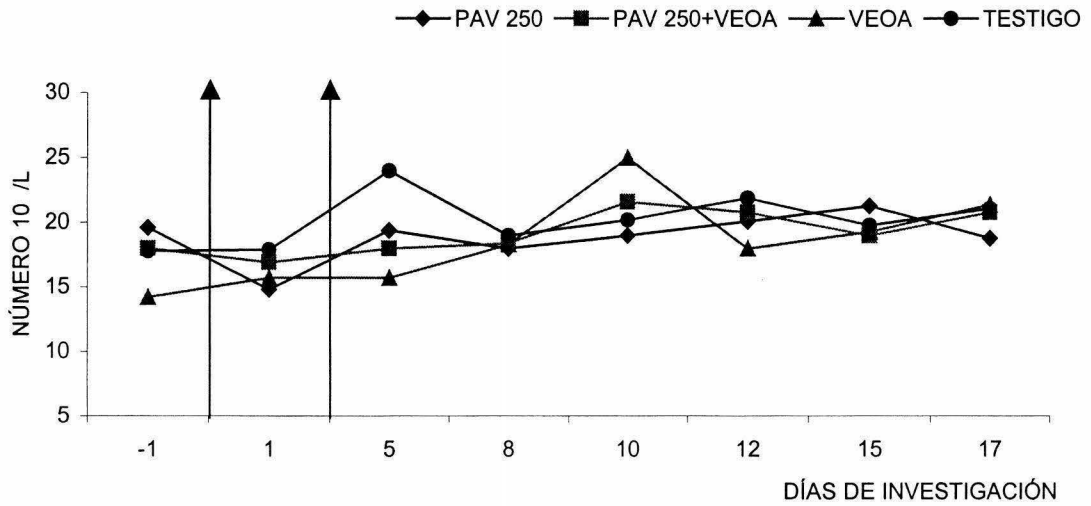


Figura 4. Promedio de leucocitos sanguíneos de los cerdos Pelón Mexicano durante la fase experimental.

* Vacunación contra la FPC con la PAV-250 día 0.

** Inoculación con el VEOA día 3.

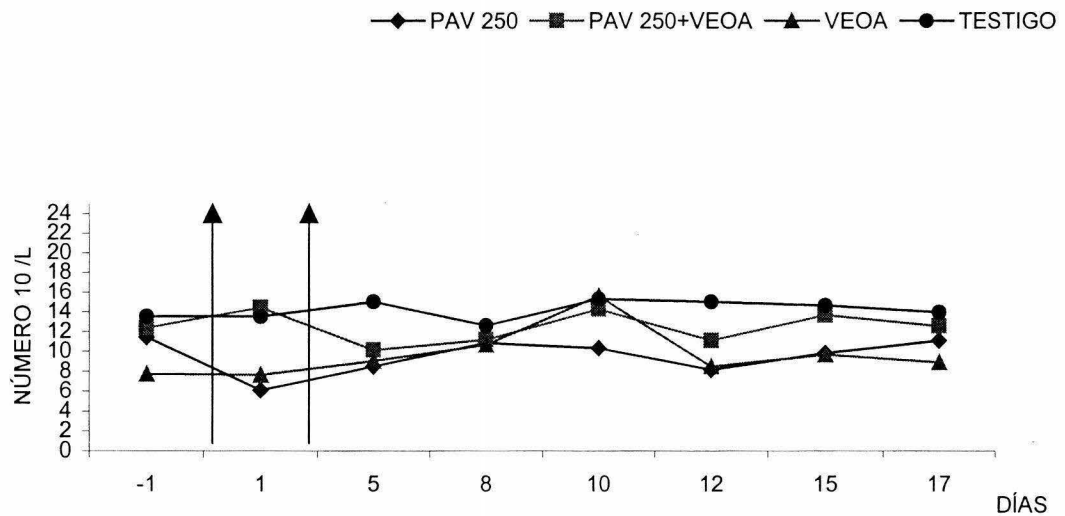


Figura 5. Promedio de linfocitos sanguíneos de los cerdos Pelón Mexicano durante la fase experimental.

* Vacunación contra la FPC con la PAV-250 día 0.

** Inoculación con el VEOA día 3.

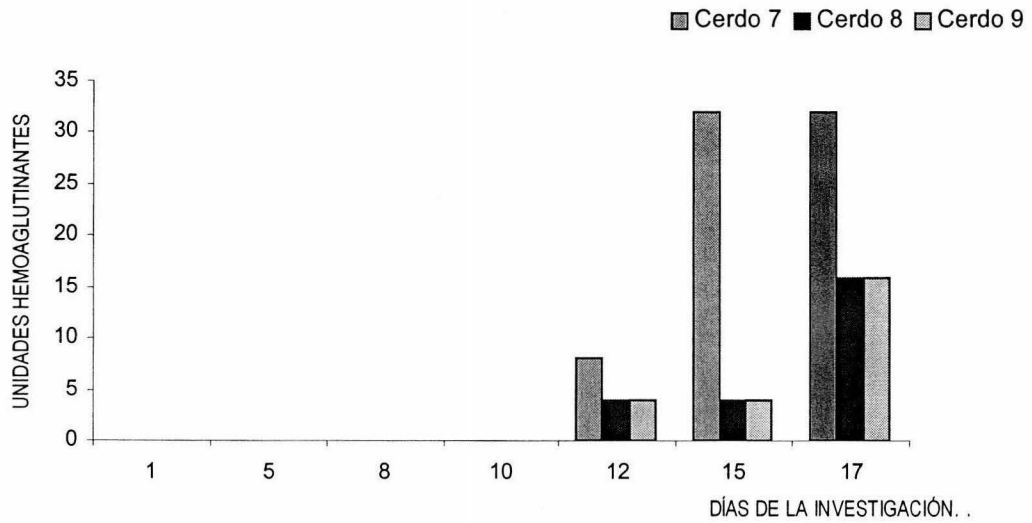


Figura 6. Grupo 3. Títulos de Acs contra el *Rubulavirus porcino* en los cerdos inoculados con el virus.

** Inoculación con el VEOA día 3.

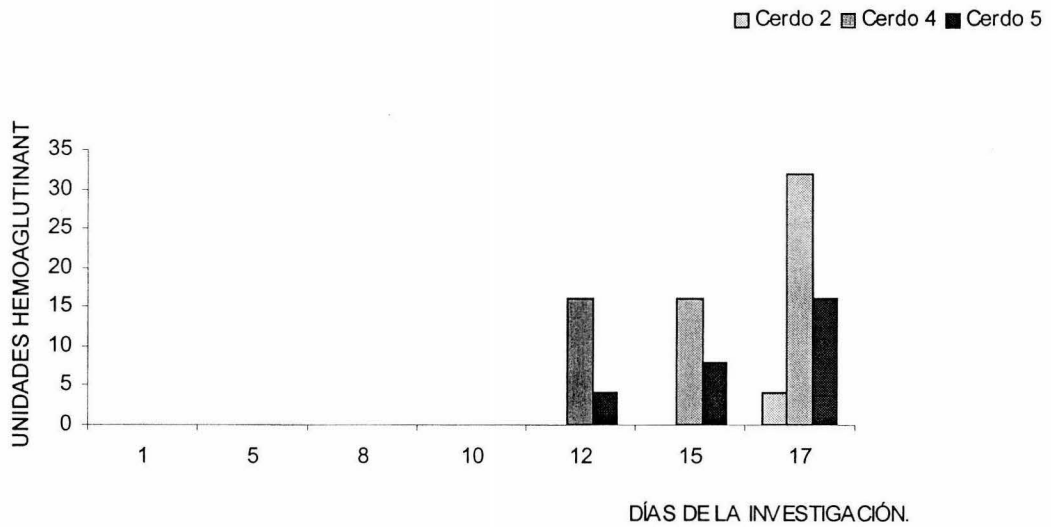


Figura 7. Grupo 2. Títulos de anticuerpos contra el *Rubulavirus porcino* en los cerdos inoculados con este virus y vacunados con la PAV 250.

* Vacunación contra la FPC con la PAV-250 día 0.

ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA

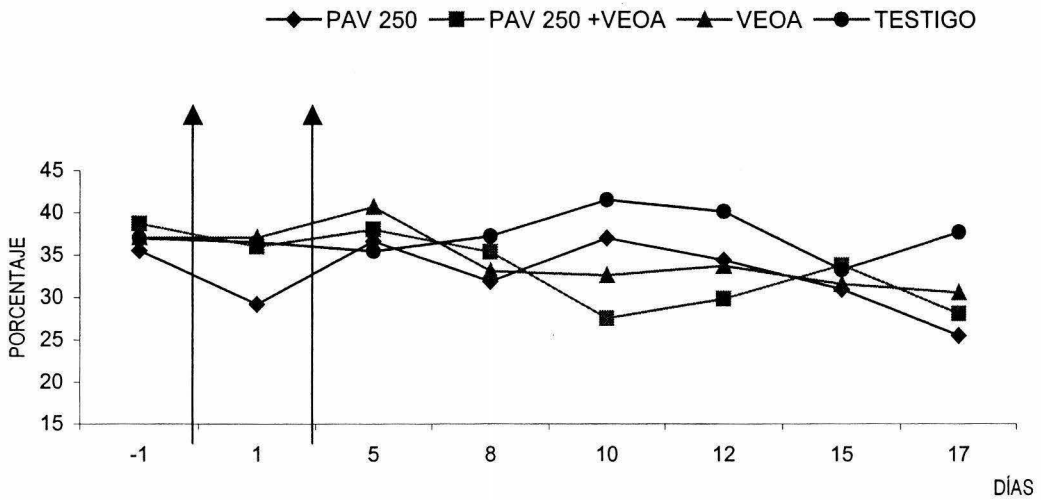


Figura 8. Comportamiento de los linfocitos sanguíneos CD4+CD8- en cerdos Pelón Mexicano vacunados con PAV 250 e inoculados con el *Rubulavirus porcino*.

* Vacunación contra la FPC con la PAV-250 día 0.

** Inoculación con el VEOA día 3.

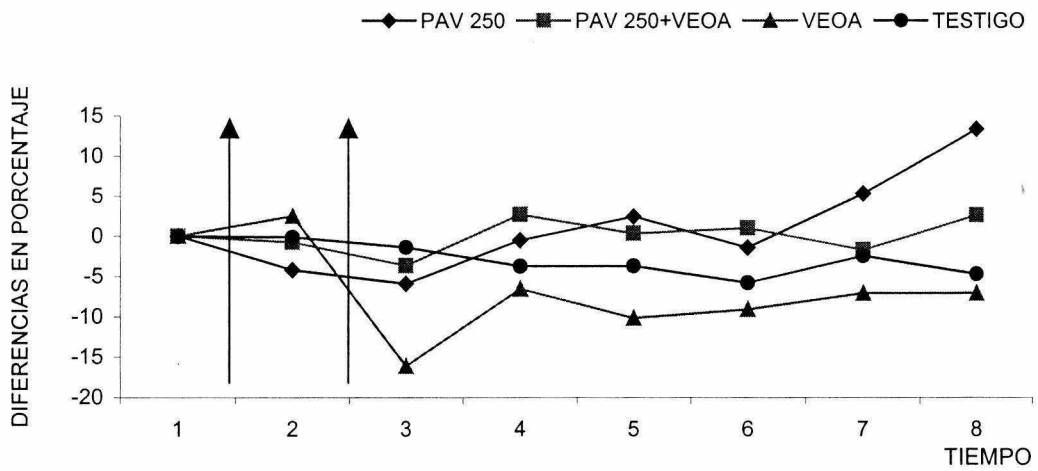


Figura 9. Comportamiento de los linfocitos sanguíneos CD4+CD8+ en cerdos Pelón Mexicano vacunados con PAV 250 e inoculados con el *Rubulavirus porcino*.

* Vacunación contra la FPC con la PAV-250 día 0.

** Inoculación con el VEOA día 3.

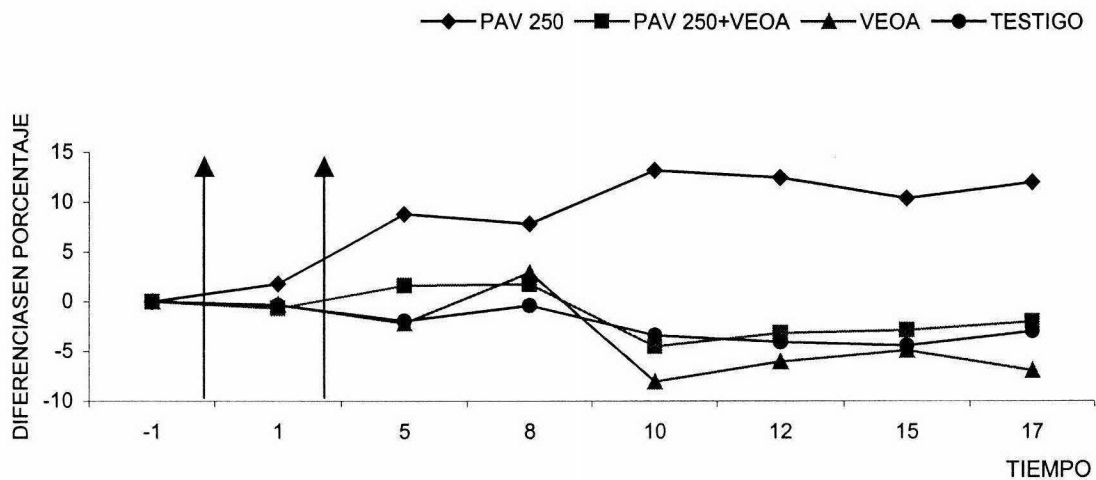


Figura 10. Comportamiento de los linfocitos sanguíneos CD4-CD8- en cerdos Pelón Mexicano vacunados con la PAV 250 e inoculados con el *Rubulavirus porcino*.

* Vacunación contra la FPC con la PAV-250 día 0.

** Inoculación con el VEOA día 3.

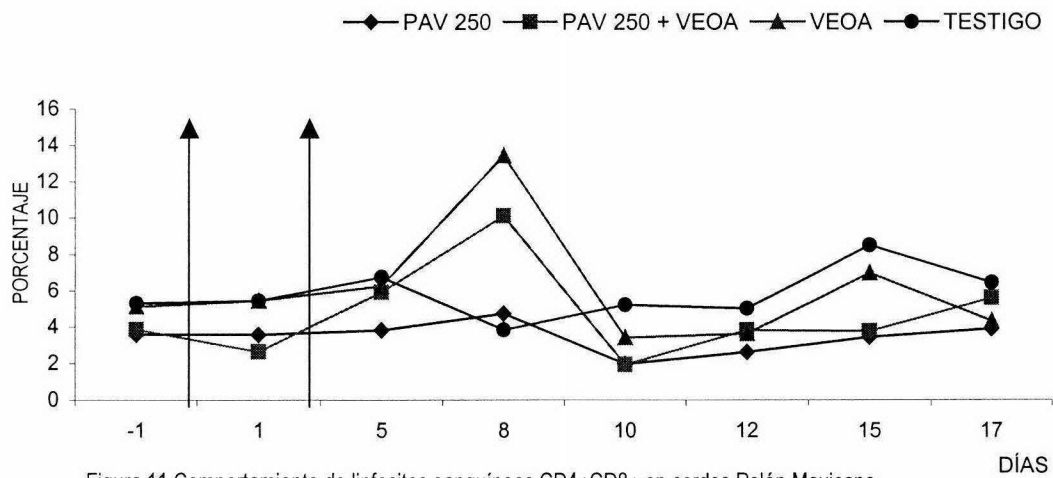


Figura 11. Comportamiento de linfocitos sanguíneos CD4+CD8+ en cerdos Pelón Mexicano vacunados con PAV 250 e inoculados con *Rubulavirus porcino*.

* Vacunación contra la FPC con la PAV-250 día 0.

** Inoculación con el VEOA día 3.