UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISION DE CIENCIAS VETERINARIAS

TESIS:

"EVALUACION DE UNA NUEVA VACUNA CONTRA FIEBRE PORCINA CLASICA, CEPA PAV-255"

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:
PMVZ. JOSE MANUEL MORENO MONROY

DIRECTOR DE TESIS:
MVZ. HECTOR GONZALEZ TORRES

LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JAL. AGOSTO DE 1995

CONTENIDO:

RESUMEN..... I

INTRODUCCION..... 1

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... 9

JUSTIFICACION..... 10

HIPOTESIS..... 11

OBJETIVOS..... 12

MATERIAL Y METODOS..... 13

RESULTADOS..... 18

DISCUSION..... 22

CONCLUSIONES..... 24

BIBLIOGRAFIA..... 25

RESUMEN:

La Fiebre Porcina Clàsica apareciò el siglo pasado en los Estados Unidos; y alcanzò ràpidamente distribuciòn mundial, constituyendo una causa grave de pèrdidas econòmicas a la porcicultura. Actualmente tiene importancia en comercio internacional, ya que los paìses desarrollados son libres de FPC y no reciben productos porcinos de paises que sean positivos a ella, por lo que en Mèxico la campaña de erradicaciòn se ha intensificado, èsta se basa en vacunaciòn masiva y control de movilizaciòn. Las vacunas de elecciòn son aquellas seguras, eficaces y que no difundan, actualmente la Secretaria de Agricultura y Recursos Hidràulicos autoriza sòlo 6 cepas. El objetivo del presente trabajo es evaluar una vacuna cepa PAV-255, que es una de las autorizadas, para tal efecto, a la semilla maestra (virus original de producciòn) y primer lote (lote 01 exp) de una vacuna contra Fiebre Porcina Clásica, cepa PAV-255, se les realizaron diversas pruebas, a fin de determinar la eficacia, seguridad e inocuidad del producto. Las pruebas realizadas fueron: Pureza (esterilidad y agente viral extraño), identidad viral, inocuidad y seguridad, potencia por titulación (desafío) diseminación y cohabitación viral. Transcurridas las pruebas, la vacuna demostró ser inocua, no contener agentes contaminantes bacterianos ni virales, ser segura, proteger a los cerdos contra desafíos de cepas patógenas de FPC y no diseminar de cerdos vacunados a cerdos susceptibles sin vacunar. Por lo anterior se concluyó que la vacuna es un producto inocuo, seguro y eficaz para proteger a cerdos contra la Fiebre Porcina Clásica.

INTRODUCCION.

La Fiebre Porcina clásica (FPC), desde su aparición, a raíz del inicio de las grandes concentraciones de cerdos en el siglo pasado, ha sido una de las principales causas de pérdidas económicas para la actividad porcícola (13, 19).

Probablemente el origen de la **FPC** se mantendrá a nivel de conjetura. La primera descripción de una enfermedad parecida a **FPC** fue hecha en 1810 debido a un brote en Tennesse, Estados Unidos. Más tarde fueron reportados brotes en Ohio, durante la década de 1830. También se mencionan brotes que probablemente fueron **FPC** en Francia (1822) y Alemania (1833) (19).

Sin embargo, otros reportes mencionan que la enfermedad no existió en Europa sino hasta 1866, cuando apareció en Inglaterra y posteriormente se diseminó al resto del continente (13, 17).

La **FPC** llegó a tener una distribución mundial pero actualmente ha sido erradicada de Estados Unidos, Canadá, la mayoría de Europa y Japón (1, 19).

Los primeros brotes en México se dieron en 1883, en la zona del Bajío, donde tradicionalmente se han localizado concentraciones de cerdos, desde entonces se presentaron en México epizootias que muchas veces diezmaron la población porcina de zonas enteras (1) .

La etiología viral de ésta enfermedad fue demostrada hasta 1903 por Schweinitz y Dorsett, quienes lograron reproducir la enfermedad por medio de líquidos infectados que habían sido previamente filtrados a través de membranas que retenían bacterias (19). Actualmente, el agente etiológico de la **FPC** ha sido clasificado dentro de la familia Togaviridae y en el género de los pestivirus (13). El virus de la **FPC** es **RNA** de una sola cadena, tiene una envoltura de lípidos, posee forma esférica y mide de 40 a 50 mm de diámetro (14).

El cerdo es el único hospedero natural del virus de la **FPC**, la enfermedad es altamente contagiosa y las características pantotrópicas del virus hacen de ella un proceso que involucra problemas respiratorios, entéricos y en

fases avanzadas nerviosos, con características hemorragias generalizadas e infartos en órganos internos (9, 13, 18, 19).

Los signos típicos de la enfermedad son agudos, en un inicio hay anorexia, fiebre alta (41°C), temblores musculares, apatía y amontonamiento, puede haber estreñimiento alternado con diarrea, se aprecian manchas rojizas en abdomen y cara interna de muslos, posteriormente pueden presentarse signos respiratorios severos y en etapas finales manifestaciones de tipo nervioso. Hasta hace poco tiempo ésta fue la idea que prevaleció acerca de la enfermedad: Un proceso agudo y de diseminación explosiva, sin embargo, éste concepto ha sido modificado a la luz de nuevos conocimientos que marcan la tendencia hacia la aparición de cuadros clìnicos de tipo crónico en animales adultos, y otras manifestaciones poco frecuentes como tremores congénitos tipo A1, **FPC** aguda en neonatos, **FPC** postvacunal de baja patogenicidad, etc. (1, 18).

Desde que la enfermedad empezó a difundirse hubo incipientes intentos de prevenirla. En 1880, el inventario porcino en México había llegado a las 800,000 cabezas, pero a raíz de una epizootia de **FPC** se redujo a 400,000 (1), lo cual motivó que en esas fechas se iniciaran intentos de prevenir la enfermedad mediante rudimentarios procesos de vacunación. Existe un comunicado impreso de un Médico Veterinario Mexicano, que a principios de siglo practicaba la inmunización contra **FPC** aplicando dos dosis de sangre de animales infectados, la primera diluida, con intervalos de una semana.

Posteriormente aparecieron otros sistemas para prevenir la enfermedad. Una de las principales formas de prevenir la **FPC** fue el uso de sueros hiperinmunes (9), que empezaron a utilizarse en los Estados Unidos durante las primeras décadas del presente siglo. Más tarde, en los años de 1920 a 1925 se generalizó la práctica de aplicar virus virulento simultáneamente con suero hiperinmune, a pesar de los altos riesgos que esto implicaba, se encontró que confería una inmunidad sólida y duradera (9, 13).

También en la primera mitad de éste siglo aparecieron vacunas inactivadas con cristal violeta, éstas tenían la ventaja de no difundir el virus, pero su aplicación aportaba una protección muy pobre (9, 7).

Los biológicos anteriores podrían ser considerados como la primer generación de productos encaminados a prevenir la **FPC**, sin embargo, su uso se abandonó por presentar las siguientes deficiencias:

A) Los sueros hiperinmunes confieren una inmunidad pasiva, cuya capacidad de protección no va más allá de las 4 semanas.

B) El uso de virus virulento mas suero hiperinmune difunde el virus en la naturaleza, lo cual virtualmente perpetúa la enfermedad, además la falla del suero hiperinmune podría provocar brotes severos de la enfermedad.

C) Las vacunas inactivadas han demostrado ser poco efectivas (8, 9), además de requerir refuerzos de inmunización, y en caso de inactivación incompleta tienen el riesgo de revertir a virulencia.

Otro tipo de vacunas, éstas a base de virus atenuados, son las lapinizadas, es decir. los virus originales fueron atenuados mediante pases sucesivos en conejos, las hay de alto y bajo pasaje (7, 9, 13). Las de bajo pasaje son vacunas de virus poco atenuados, las cuales se deben aplicar simultáneamente con suero hiperinmune, ya que conservan una elevada virulencia, éstas vacunas tienen la desventaja de que producen reacciones post-vacunales en ocasiones muy severas, también difunden el virus vacunal poco atenuado, y de ésta forma pueden revertir la virulencia después de varios pases. Si se aplican sin suero, o con suero de potencia insatisfactoria, pueden producir hasta un 20% de mortalidad (8, 9).

Las vacunas lapinizadas de alto pasaje, conocidas como cepa china, son muy atenuadas, y se han reportado buenos resultados con su uso. Se sabe que pueden aplicarse incluso a cerdas gestantes sin que halla reacciones desfavorables (8, 9).

El último grupo, compuesto por los productos de desarrollo más reciente comprende aquellas vacunas que han sido atenuadas por pases en cultivos celulares. Estas vacunas han demostrado ser más eficaces e inocuas que las anteriores (5, 7, 9, 17).

La vacuna **GPE** (cepa japonesa), fue obtenida mediante más de 180 pases en cultivos celulares, durante los cuales perdió su patogenicidad pero retuvo sus características antigénicas. La vacuna se desarrolló en Japón y fue el instrumento en que se basó la campaña de erradicación de **FPC** en dicho país, iniciada a finales de 1968 y concluida exitosamente en 1975 (3).

La vacuna **PAV-250** fue obtenida en la Universidad de Cornell (Ithaca, N.Y. y Estados Unidos). mediante 250 pases en cultivos celulares. Esta cepa fue estudiada en el Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias (INIP), de la Secretarìa de Agricultura y Recursos Hidràulicos (SARH), y se concluyó que es completamente inocua y confiere una excelente protección (6), lo cual se ha comprobado en pruebas de campo así como en condiciones controladas de laboratorio. Se ha demostrado que ésta cepa no difunde a otros cerdos, pues al poner cerdos vacunados en contacto con susceptibles, éstos no han desarrollado resistencia, puesto que siempre han muerto ante la posterior exposición al virus virulento (5, 6, 7), En una prueba se observó que 2 de los 5 cerdos susceptibles puestos en contacto desarrollaron títulos inhibitorios sumamente bajos (1:4), detectados por prueba de inhibición de focos fluorescentes; sin embargo; éstos cerdos también murieron ante la exposición, por lo que probablemente no se trataba de anticuerpos específicos contra **FPC**.

En un estudio del INIP-SARH, Presentado en el Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos (AMVEC) de 1988, se demostró que la vacuna cepa PAV-250 protegía al 100% de los lechones vacunados al día 1 y 7 de edad (Coba y col. 1988). Otros autores han probado la vacuna **PAV-250** en cerdas gestantes y en celo, y han reportado que ha sido completamente inocua para la hembra y los fetos (4).

Cabe mencionar que el virus de la **FPC** cruza antigénicamente con el virus de la Diarrea Viral Bovina **(BVD)**, lo que ha originado que a nivel experimental se hayan hecho intentos de inmunización contra **FPC** utilizando dicho virus. En algunos estudios realizados por Baker y Col. (1969), se encontró que la cepa **BVD NY-1** protegía contra algunas cepas de **FPC**, pero no contra todas (9). En México se ha estudiado la cepa **BVD ANDY-1**, que fue pasada 17 veces en cerdos, ésta cepa no es patógena para el cerdo, y en pruebas de desafío protegió en 94% contra virus virulento de **FPC** cepa Cornell, y en 84% contra el virus virulento cepa AMES (7).

En el cuadro siguiente aparecen las vacunas actualmente autorizadas por la Dirección General de Salud Animal de la SARH para su uso en la república Mexicana:

LABORATORIO	CEPAS	NOMBRES	NO.REGISTRO
ANCHOR	GPE/MINN	VCCP*	B0171-028
BIOZOO	PAR-147	VCCP	B0104-009
HOECHST	GPE/PAV-1	PORCIVAC	B0681-006
LAPISA	GPE	CERVAC	B2083-005
NORDEN	GPE/CHINA	NORVAC/VADIMUNE	B0143-054
PRONABIVE	GPE/PAV-250	VCCP	B0658-015
SANFER	PAV-250	COLVASAN	B0132-004
SYNTEX	MINN-1/CHINA	CERTIGEN/VONG	B0937-002

* Vacuna contra Cólera Porcino. Tomado del Manual de Normas y Procedimientos de Campaña contra CP (SARH).

La cepa **PAR-147** se atenúo en el Cornell Research Institute (Ithaca, N.Y., U. S. A.) mediante 147 pases en cultivos celulares de cerdos y conejos, y fue adaptada a cultivo celular de línea estable (Información Técnica BIOZOO, S. A. de C. V.). La cepa Minnesota se obtuvo mediante 193 pases en cultivo primario esplécnico de conejo y posteriormente se adaptó a línea celular estable (Información Técnica de ANCHOR, S. A. de C. V.). Ambas cepas han demostrado una buena antigenicidad, pero aparentemente conservan cierta virulencia, ya que está contraindicado aplicarla a cerdas gestantes.

Resumiendo, hemos visto que el desarrollo de los productos biológicos contra **FPC**, ha ido desde productos efectivos pero de uso muy riesgoso, hasta las actuales vacunas que son de excelentes propiedades (seguras, inocuas, económicas y no difunden), lo cual las acerca bastante a la vacuna ideal, y nos pone en situación de aspirar, mediante programas estrictos de vacunación, a erradicar de nuestras piaras tan costosa enfermedad (1).

La **FPC** ha sido erradicada de Estados Unidos, Japón y numerosos países europeos, basándose en campañas de vacunación (3, 13, 19).

Actualmente en México la Campaña Nacional contra **FPC** ha rendido frutos satisfactorios. Esta campaña fue revitalizada substancialmente a partir de 1990, los principios en que se sustentaron las acciones de refuerzo, fueron los de revisar los aspectos básicos de la campaña y que se agrupan en los siguientes rubros (12):

A) Normatividad General.- Elaboración del Manual de Normas y Procedimientos de Campaña, en el cual intervinieron la AMVEC, CONAPOR, CANIFARMA área veterinaria y UNAM.
B) Control de Movilización.- Además de la tradicional exigencia de guía zoosanitaria, se ha implementado en el caso de cerdos en zona de control, la obligatoriedad del certificado de vacunación oficial, sin el cual es ilegal la movilización de cerdos. Dicho certificado debe ser expedido por un Médico Veterinario acreditado por la SARH y con el aval del Colegio Nacional de Médicos Veterinarios Zootecnistas, A. C. Dentro de éste punto, también se ha promovido la instalación de casetas de vigilancia zoosanitaria en zonas estratégicas para el control de movilización.
C) Control de Biológicos.- Desde noviembre de 1990 se ha aplicado rigurosamente la normatividad emitida por la SARH para los requisitos mínimos de las vacunas contra **FPC** que sean autorizados para la campaña.
D) Sistemas de Vigilancia y Diagnóstico.- Mejora de los canales de comunicación del Sistema Nacional de Vigilancia Epizootiológica. También se seleccionaron a 5 laboratorios de la Red Nacional de Laboratorios de Diagnóstico considerados como estratégicos por su ubicación geográfica, éstos fueron: Tlaquepaque, La Piedad, Irapuato, Monterrey y Mérida. A dichos laboratorios se les dotó de equipo para el diagnóstico de **FPC**, y su personal fue capacitado sobre las técnicas de diagnóstico de **FPC**.
E) Organización a nivel Estatal y Regional.- Convenios entre la SARH y gobiernos de los estados que permiten reforzar las acciones de campaña.
F) Estructura Operativa.- La constitución de Comités Estatales de Fomento y Protección Pecuaria, y dentro de éstos los subcomités para la erradicación de la FPC, conjuntamente con la acreditación por parte de la SARH de Médicos Veterinarios Zootecnistas dentro de la Campaña Nacional. Lo anterior representa la estructura operativa que complementa las acciones de coordinación y supervisión de las delegaciones de la SARH; y el normativo, y evaluador del nivel central.

G) Comunicación Social.- Constitución del programa integral de comunicación social en apoyo de la campaña, el cual incluye aspectos técnicos y operativos en forma de artículos, carteles y trípticos, así como mensajes de radio y televisión en apoyo al productor de cerdos.
H) Acciones de Concertación.- Que cuentan con la participación de diferentes sectores relacionados con la producción porcícola, incluidos los gobiemos estatales, permitiendo un real reforzamiento de las acciones de la campaña, dentro de los nuevos lineamientos de desconcentración, descentralización y participación del propio productor dentro de las diferentes campañas zoosanitarias.

Dentro del control de Biológicos la SARH ha implementado normas rigurosamente estrictas, que incluyen la obligatoria constatación de la semilla maestra de cada una de las cepas autorizadas, así como la confirmaciòn de todos los lotes producidos, incluyendo pruebas de control de calidad y pruebas de potencia por desafío [1] .

Las diversas fases de campaña se han dividido de la siguiente manera (12):

A) Zona Libre.- Son zonas en donde está prohibida la vacunación y hay un control en extremo estricto de movilización.

B) Zona de Erradicación.- En este circulo no se vacuna y hay un control muy estricto de movilización.

C) Zona de Control.- En ella existen campañas de vacunación y hay un control estricto de movilización.

Las acciones anteriores han permitido que en la actualidad los estados de Sonora, Baja California Norte y Sur estén libres de **FPC**. Los estados de Sinaloa, Chihuahua, Nuevo León, Coahuila y Tamaulipas, estén en fase de erradicación, mientras que el resto de la república se encuentra como zona de control.

---

[1] Manual de Procedimientos de Constatación de Productos Biológicos Para Uso en animales, SARH-CANIFARMA, 1988.

Los logros citados se han obtenido en base a control de movilización y vacunación principalmente, lo cual remarca la importancia de el uso de biológicos adecuados, ya que en base al uso de vacunas seguras, efectivas y que no difundan a otros cerdos, es posible controlar la **FPC**. Por el contrario, si se usaran productos que difundieran o tuviesen alta virulencia, estaría latente la posibilidad de originar focos de infección por transmisión de virus vacunal a cerdos susceptibles, transmisión a cerdas gestantes con afección a fetos, o posible aparición de brotes de **FPC** post-vacunal por mal manejo del producto utilizado (7, 9).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

En México, durante muchos años, la **FPC** fue la enfermedad que más pérdidas causó al sector porcícola (1, 9, 18). De 1973 a 1979 se reportaron 3,994 brotes de **FPC**, lo que dió un promedio de 570 focos anuales, mientras que de 1980 a 1982 fueron reportados 935 focos (9). Existe un reporte de 1983 que calculaba en 1,200 millones de pesos las pérdidas anuales registradas por brotes de **FPC,** sin embargo, menciona que tales pérdidas podrían ser mayores debido a que muchos brotes no eran reportados (5). Por otra parte fuentes distintas calculaban en el mismo año, que las pérdidas ascendían a un monto de 4,000 a 5,000 millones de pesos (18).

El último gran brote de **FPC** aconteció en 1989, en el cual quedó patente la trascendencia de la enfermedad, ya que causó pérdidas por más de 17,500 millones de pesos (10).

Aunque en los últimos años, merced al control estricto de biológicos por parte de SARH, y a la revitalización de la Campaña Nacional contra **FPC**, las pérdidas económicas han disminuido, la **FPC** sigue siendo un fuerte obstáculo para el desarrollo de la porcicultura mexicana, ya que dicha enfermedad tiene una fuerte implicación en el comercio internacional. Los países libres de **FPC** prohiben la importación de todo tipo de productos porcinos provenientes de países que son positivos a la enfermedad, de tal suerte que México está en grave desventaja a ese respecto, especialmente ante la perspectiva del tratado de libre comercio, ya que dicho convenio programaría en un lapso de 15 años el tráfico libre de aranceles de los productos agropecuarios de los tres países involucrados.

Sin embargo, seguirán existiendo barreras no arancelarias, como aquellas de tipo zoosanitarias. Es decir, que México, al tener en su territorio la **FPC**, vería truncadas sus expectativas de exportar carne de cerdo a Estados Unidos y Canadá, que estan libres de **FPC.** Lo anterior aunado a los bajos costos que se logran en dichos países, debido principalmente a la disponibilidad de grano abundante y barato, y al alto nivel de subsidios que benefician a los productores pecuarios de esos países, podrían, debido a la importación de carne de cerdo y subproductos, dejar en situación de quiebra a la porcicultura nacional.

Ante tal panorama, es imprescindible el refuerzo de la Campaña Nacional contra **FPC** y dentro de ello es importante contar con las vacunas adecuadas para el éxito de la campaña.

JUSTIFICACION

La situación actual de la **FPC** en México está en proceso de control, los brotes ultimamente han disminuido gracias a la Campaña Nacional contra **FPC**. Como se mencionó anteriormente, uno de los pilares de la campaña ha sido la vacunación, y para ello se han autorizado por la SARH sólo aquellos productos que sean inocuos, seguros y eficaces.

Ahora bien, la **FPC** ha sido erradicada de todos los países desarrollados, por lo cual la investigación referente a dicha enfermedad, prácticamente ha sido nula durante los últimos años, ya que sólo existe en países subdesarrollados, que no tienen los recursos necesarios para investigar sobre ella. Afortunadamente poco antes de la erradicación de la **FPC** en Estados Unidos se llegó a desarrollar la vacuna **PAV-250**, que presenta excelentes características, y que es directamente precursora de la cepa **PAV-255**, que se pretende evaluar en el estudio propuesto en el apartado de material y métodos.

La preferencia de los porcicultores se ha orientado hacia las vacunas con cepas **PAV-250 y PAV-1,** por lo que los laboratorios han mostrado la tendencia a dejar de producir las cepas GPE y CHINA [2]

Por lo anterior, la vacuna objeto del presente estudio, elaborada en base a virus activo modificado cepa **PAV-255**, al ser aprobada por la SARH podría ser una buena herramienta para lograr la erradicación de la **FPC** en nuestro país.

---

[2] Reportes de vacuna **FPC** producida según datos de la Dirección de Servicios y Registros Zoosanitarios de la SARH.

HIPOTESIS

Los cerdos vacunados con la cepa **PAV-255** contra **Fiebre Porcina Clásica**, tendrán una respuesta inmune detectable por elevación de títulos de anticuerpos, la cual consideramos que será suficiente para proteger a los cerdos contra cepas patógenas del virus de **Fiebre Porcina Clásica**.

BIBLIOTECA CENTRAL

OBJETIVOS

A) GENERAL: Evaluar la vacuna contra **Fiebre Porcina Clásica** cepa **PAV-255** mediante pruebas de control de calidad para biológico terminado y prueba de desafío en cerdos.

B) PARTICULARES:

1.- Conocer el grado de inocuidad y seguridad de la vacuna.

2.- Determinar el nivel de protección y títulos de anticuerpos que la vacuna causa en cerdos.

3.- Determinar el grado de diseminación de virus vacunal en cerdos.

MATERIAL Y METODOS:

Las pruebas de evaluación de la vacuna contra **FPC** cepa **PAV-255** fueron realizadas en la semilla maestra viral y en el primer lote experimental de producción (lote 01 exp.).

Para lo anterior se siguió la metodología detallada a continuación:

A) PRUEBAS DE PUREZA: Los viales de prueba, tanto de la semilla maestra como del lote 01 exp. son frascos ámpula de vidrio de 50 ml de capacidad, conteniendo el virus liofilizado. Estos frascos se reconstituyen con 30 ml de agua destilada estéril empleando jeringas y agujas estériles. Para las pruebas de pureza fue necesario utilizar 2 viales de semilla maestra y dos de lote 01 exp. Las pruebas de pureza realizadas fueron las siguientes:

1. **Prueba de esterilidad**: Se inocularon los siguientes medios de cultivo:

a) Caldo Tioglicolato.- Se inocularon 5 tubos pyrex con tapón de rosca conteniendo 40 ml de medio estéril, empleándose para ello 2 ml de semilla maestra, y se dejaron en incubación durante 21 días a 37°C. La inoculación de los tubos se realizó dentro de un módulo estéril de flujo laminar, trabajando siempre cerca de un mechero Fisher. El mismo manejo se realizó para el lote 01 exp. Los tubos fueron incubados en una estufa de cultivo marca "ecosa", de 1m^3 de capacidad, calibrada a 37°C.

b) Caldo soya tripticaseína.- Se realizó un manejo igual que en tioglicolato.

c) Caldo soya tripticaseína.- Se realizó un manejo igual que en los anteriores, con la diferencia de que éstos tubos se incubaron a 25°C, empleándose para ello una estufa de cultivo marca "Barnstead", de 300 cm^3 de capacidad, calibrada a 25°C

d) Agar sangre.- Se hizo siembra masiva de 1.5 ml de semilla maestra por caja petri de agar sangre (Base de agar sangre marca "Bioxon" dicionada de 5% de sangre desfibrinada estéril de conejo), posteriormente diseminada por estriación con asa bacteriológica, el proceso se llevó a cabo dentro de un módulo estéril de flujo laminar y trabajando cerca de un mechero Fisher. Las cajas petri fueron selladas con una cinta engomada de papel (masking tape), para evitar su deshidratación, y se incubaron durante 14 días a 37°C, en la misma estufa en que se incubaron los tubos con medio líquido. El mismo manejo se llevó a cabo para el lote 01 exp.

2. <u>Prueba de agente viral extraño</u>: A la vacuna contra **FPC** cepa **PAV-255**, se le realizan pruebas para determinar que esté libre de virus de la Enfermedad de Aujeszky y Parvovirus porcino, como se describe a continuación:

a) Virus de la enfermedad de Aujeszky.- Para determinar que la vacuna esté libre de virus de la Enfermedad de aujeszky se hace una prueba de inocuidad en conejos que será descrita más adelante.

b) Parvovirus porcino.- Se usaron 6 frascos planos para cultivos celulares (Falcon, cat. 28185-076), de 25 cm^2 de superficie con dos cubreobjetos cada uno de 25 x 7 mm e incluidos dentro de éllos, en estos frascos fueron desarrollados cultivos celulares de línea estable PK-15 hasta una confluencia de un 90% . Hecho lo anterior, 3 frascos fueron inoculados con un ml. de semilla maestra cada uno, y dos fueron innoculados con un ml. del lote 01 Exp., el frasco restante no fue inoculado con el fin de que sirviera como testigo negativo. Después de la inoculación se dejó incubar durante 48 horas, pasados las cuales, los cubreobjetos fueron extraídos empleando unas pinzas de kelly, y se fijaron las células a los cubreobjetos sumergiéndolos durante un minuto en metanol. Posteriormente los cubreobjetos fueron tratados con un conjugado de anticuerpos fluorescentes contra Parvovirus porcino (Origen AMBICO, CO., Dallas Center, IA, USA), una vez preparadas las laminillas (montadas sobre portaobjetos), estas fueron leídas en un microscopio con fuente de luz fluorescente (Microstar V, Reichter-Jung).

B) PRUEBA DE IDENTIDAD VIRAL: El virus **PAV-255** se identifica por su capacidad de protección a cerdos susceptibles vacunados con él, contra desafíos con cepas patógenas de **FPC**, Para ésta identificación se tomaron en cuenta los resultados de la prueba de potencia detalladas en el inciso "D". También el virus **PAV-255** se identificó por inoculación en células PK-15 que posteriormente fueron tratadas con anticuerpos fluorescentes contra **FPC**, la técnica fue esencialmente la misma que se siguió para determinar que la vacuna y semilla maestra estuvieran libres de parvovirus porcino, haciendo notar que hubo las siguientes diferencias:

1. Los frascos fueron inoculados con 0.5 ml de semilla maestra o lote 01 exp.

2. Los frascos fueron incubados durante 72 horas.

3. Las células fueron tratadas con conjugado fluorescente contra **FPC** (ORIGEN AMBICO, CO., Dallas Center, IA, USA).

C) PRUEBA DE INOCUIDAD Y SEGURIDAD: (Sólo se realizó en el lote 01 exp.)

1. **En cerdos**: Se obtuvo un grupo de 5 cerdos de entre 10 y 14 Kg de peso, sanos, procedentes de una granja de Ixtlahuacán del Río, Jal. A éstos cerdos se les inocularon 10 ml de vacuna por vía intravenosa y se observaron diariamente durante 14 días.

2. **En ratones**: Se seleccionó un grupo de 8 ratones suizos blancos, sanos, los cuales fueron inoculados con 0.2 ml de la vacuna reconstituida, empleando la vía subcutánea. Los animales se dejaron en observación durante un período de 10 días.

3. **En conejos**: Se seleccionó un grupo de 5 conejos adultos, se inocularon con un ml de la vacuna reconstituida vía subcutánea. Se dejaron en observación durante un período de 10 días.

D) **PRUEBA DE POTENCIA POR TITULACION EN CERDOS**: Se obtuvo un grupo de 21 cerdos sanos de 7 semanas de edad, seronegativos a **FPC**, procedentes de una granja libre de anticuerpos, ubicada en el estado de Sonora. Los cerdos antes mencionados fueron distribuidos en los siguientes grupos:

1. **GRUPO 1**. (Titulación de la semilla maestra **PAV-255**): Este grupo se formó con 9 cerdos, divididos en 3 grupos de 3 cerdos cada uno, los cuales fueron vacunados con semilla maestra reconstituida y diluida en 10^2, 10^3 y 10^4 respectivamente.

2. **GRUPO 2**. (Titulación del lote 01 Exp.): Este grupo se formó con 7 cerdos, divididos en 2 subgrupos de tres y cuatro cerdos respectivamente, los cuales fueron vacunados con el lote 01 Exp. en diluciones respectivas de 10^2 y 10^3.

3. **GRUPO 3.** Este grupo se compuso de 5 cerdos controles no inmunizados.

Todos los cerdos de los 3 grupos fueron desafiados el día 14 post-vacunación, con un ml de virus de desafío cepa AMES de **FPC**, con un título de 10^6 PID/ml. Los cerdos se mantuvieron en observación durante un período de 10 días, y cada uno de los grupos se mantuvo en cuartos de prueba independientes.

E) **PRUEBA DE DISEMINACION Y COHABITACION VIRAL**: (Solo lote 01 Exp.)

Se realizó ésta evaluación para determinar en forma experimental la eliminación de virus post-vacunal y su importancia como factor potencial de transmisión de virus.

Se seleccionó un grupo de 8 cerdos sanos, seronegativos a **Fiebre Porcina Clásica**, procedentes de una granja libre de anticuerpos contra **FPC**, ubicada en el estado de Sonora. Estos cerdos se dividieron en 2 grupos de cuatro, uno de los cuales fue vacunado con 2 ml de vacuna **PAV-255** lote 01 Exp. sin diluir. El segundo grupo no fue vacunado.

Los cerdos de ambos grupos se mantuvieron en íntimo contacto en el mismo cuarto durante el desarrollo de la prueba.

Todos los cerdos fueron desafiados al día 14 post-vacunación, con virus virulento de desafío cepa AMES título de 10^6 PID/ml, empleándose un ml por animal. Los cerdos fueron sangrados al día 14 para determinar niveles de anticuerpos contra **FPC**, empleándose para ello la técnica de seroneutralización. Los animales fueron observados durante 10 días post-desafío, anotándose sobrevivientes y muertos, así como toda probable reacción adversa observada.

RESULTADOS:

A. RESULTADOS DE PRUEBA DE PUREZA:

1. Pruebas de esterilidad:

a. Caldo Tioglicolato.- Tras 21 días de incubación no se presentó desarrollo alguno en ninguno de los tubos inoculados, ni de la semilla maestra ni de lote 01 exp.

b. Caldo soya tripticaseína incubado a 37°C.- Al terminar la prueba en ninguno de los tubos inoculados se encontró desarrollo, ni de la semilla maestra ni de lote 01 exp.

c. Caldo soya tripticaseína incubado a 25°C.- Al terminar la prueba en ninguno de los tubos inoculados se observó desarrollo, ni en la semilla maestra ni en lote 01 exp.

d. Agar sangre.- Al terminar los 14 días de incubación no se observó desarrollo en ninguna de las cajas petri inoculadas, ni de la semilla maestra ni de lote 01 exp.

2. Prueba de agente viral extraño:

a. Virus de la Enfermedad de Aujeszky.- Tras un período de observación de 10 días, ninguno de los 5 conejos inoculados con el lote 01 exp. presentó reacción adversa alguna.

b. Parvovirus porcino.- Al realizar la prueba de anticuerpos fluorescentes contra parvovirus, ninguno de los cubreobjetos presentó fluorescencia específica, fueron probadas 6 laminillas con células inoculadas con semilla maestra, 4 inoculadas con lote 01 exp. y 2 testigos sin inocular.

B. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE IDENTIDAD VIRAL:

a. Identificación por prueba de desafío: Los resultados se exponen en el inciso "D" del presente apartado.

b. Identificación por tinción con anticuerpos fluorescentes.- En las 6 laminillas de células inoculadas con la semilla maestra, así como en las 4 inoculadas con lote 01 exp. se observo una fluorescencia específica claramente positiva en más del 70% de las células. En las dos laminillas de las células dejadas como testigos no inoculados no se presentó fluorescencia específica.

C. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE INOCUIDAD Y SEGURIDAD:

Estas pruebas se corrieron sólo en el lote 01 exp. los resultados fueron los siguientes:

a. En cerdos.- Durante los 14 días post-inoculación que se observaron, ninguno de los cerdos presentó reacciones adversas como depresión, anorexia, intranquilidad, fiebre u otras. A los cerdos se les tomó diariamente la temperatura rectal, detectándose hipertermias ligeras (38.5 a 39°C máximo), atribuibles a la tensión que causaba el manejo necesario para tomar la temperatura.

b. En ratones.- Durante los 10 días de observación posteriores a la inoculación, los ratones mantuvieron un comportamiento normal en todos los aspectos, y no se observaron reacciones de irritación o dolor después de la inyección.

c. En conejos.- Los conejos inoculados no presentaron reacción adversa alguna durante el período de observación de 10 días, durante éstos el consumo de alimento y agua así como el comportamiento de los animales se mantuvo sin alteraciones, no se observaron signos de fiebre, inquietud o prurito.

D. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE POTENCIA POR TITULACION EN CERDOS:

1. Resultados de la titulación de la semilla maestra:

GRUPO	No. DE CERDOS	DILUCION	No. DE SOBREVIVIENTES
1	3	10-3	3
2	3	10-4	3
3	3	10-5	3

Observaciones: No se presentó signo adverso alguno en los cerdos

2. Resultados de la titulación del lote 01 exp:

GRUPO	No. DE CERDOS	DILUCION	No. DE SOBREVIVIENTES
1	3	10-2	3
2	4	10-3	4

observaciones: No se presentó signo adverso alguno en los cerdos.

3. Resultados del grupo control no inmunizado:

GRUPO	No. DE CERDOS	DILUCION	No. DE SOBREVIVIENTES
1	5	no vacunados	0

observaciones: Murió la totalidad de los cerdos controles en un lapso de 7 días post-desafío, presentando los signos característicos de Fiebre Porcina Clásica.

E) RESULTADOS DE LA PRUEBA DE DISEMINACION Y COHABITACION VIRAL:

1. Resultados de la prueba de desafío:

GRUPO	No. CERDOS	DILUCION	No.DE SOBREVIVIENTES
1	4	No diluida	4
2	4	No vacunados	0

Observaciones: Los cerdos vacunados no presentaron signo adverso alguno durante el período de observación de 10 días.

Los 5 cerdos no vacunados presentaron signos característicos de Fiebre Porcina Clásica, 2 de ellos murieron al día 5 post-desafío, uno al día 6, y uno presentó signos hasta el fin del período de observación y fue sacrificado al día 11.

2. Resultados de la prueba de titulación de anticuerpos:

GRUPO/CERDO	TITULO (Dilución logaritmo base 2)
1-1	1:32
1-2	1:32
1-3	1:16
1-4	1:32
2-1	—
2-2	1:2
2-3	—
2-4	—

DISCUSION:

Como se mencionó en la introducción al presente trabajo, la cepa **PAV-250** fue obtenida en la Universidad de Cornell por el Dr. J. A. Baker y col. (6). Pero ésta no se llegó a producir comercialmente debido a que en la época en que la cepa estuvo suficientemente probada, la **FPC** ya había sido prácticamente erradicada de los Estados Unidos.

Sin embargo, debido a las bondades de la vacuna, algunos investigadores mexicanos, encabezados por el Dr. Pablo Correa, del INIP-SARH, iniciaron estudios con dicha cepa, de tal suerte que se realizaron diversos estudios (4, 5, 6), cuyos resultados pueden equipararse con los del presente trabajo en muchos aspectos. En nuestro estudio, la vacuna demostró ser inocua, segura y no contener virus contaminantes, pruebas muy relacionadas entre sí, cosa confirmada en cierta medida en los estudios antes mencionados, ya que en las pruebas corridas por los investigadores del INIP la vacuna no mostró reacciones adversas incluso aplicada a lechones menores de 7 días de edad y a hembras gestantes (4, 5). En nuestro caso no se realizaron pruebas en hembras gestantes ni lechones neonatos debido al alto costo que ésto implica, sin embargo, cerdos de aproximadamente 15 Kg de peso no tuvieron reacciones adversas cuando se les aplicó 5 veces la dosis recomendada por vía intravenosa, siendo también satisfactorias las pruebas corridas en animales de laboratorio.

Además de las pruebas de inocuidad las pruebas de desafío fueron indiscutiblemente satisfactorias, ya que los cerdos testigos no vacunados murieron con signos de **FPC** post-desafío, mientras que todos los cerdos vacunados sobrevivieron, lo cual coincide con el comportamiento de la cepa en estudios anteriores.

También los resultados fueron muy similares en el estudio de diseminación y cohabitación viral, ya que tanto en los estudios de Correa y col como en los aquí presentados, los animales tanto vacunados como no vacunados se mantuvieron en estrecho contacto mezclados en el mismo cuarto, y aún cuando en nuestro estudio uno de los cerdos no vacunados presentó títulos de anticuerpos neutralizantes contra **FPC** en un nivel muy bajo (1:2), al igual que los otros 3 murió tras el desafío, mientras que los animales vacunados sobrevivieron en su totalidad, lo cual sugiere que dichos anticuerpos fueron inespecíficos, por el contrario, los animales vacunados presentaron una respuesta inmune notoria (niveles promedio mayores que 1:16) estos resultados son muy similares a los presentados por Correa y col.

Lo expuesto anteriormente sugiere que la cepa **PAV-250** o **PAV-255** es segura y confiable, ya que esta cepa se puede aplicar a cerdas gestantes y lechones pequeños sin exponer a los animales a reacciones adversas, pero si con la expectativa de obtener una excelente reacción inmune.

CONCLUSIONES:

1. La vacuna demostró esterilidad y pureza (ausencia de contaminaciòn con otros agentes virales) en pruebas de control de calidad. Tambièn se encontrò que es inocua y segura, ya que al aplicar sobredósis a cerdos y dosis altas a animales de laboratorio no se observaron reacciones adversas.

2. La vacuna posee altas cualidades inmunogènicas, ya que provocò en los cerdos vacunados una fuerte y ràpida respuesta de anticuerpos circulantes en sangre, asì como una protecciòn firme contra desafios con cepas patògenas de **FPC.** Asimismo, se comprobò que la vacuna no disemina de cerdos vacunados a no vacunados, en base a la pràcticamente inexistente respuesta serològica y muerte post-desafio de los cerdos no vacunados en la prueba de diseminaciòn y cohabitaciòn viral.

3. Por todo lo anterior se concluye que la vacuna contra **FPC** cepa **PAV-255** es un producto eficaz, confiable y seguro, y que al aplicarlo a cerdos provoca una respuesta inmune que los protegerá adecuadamente contra desafíos con cepas patógenas de FPC, sin provocar efectos colaterales o reacciones adversas.

BIBLIOTECA CENTRAL

BIBLIOGRAFIA:

1. **Aranda J.** Situación actual del Cólera Porcino en México. Memorias del Primer Simposium sobre las Principales Enfermedades Nerviosas del Cerdo. Editores Santillán, S. y Ruiz Ch.,S. Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, de Occidente. 1991.

2. **Arias I. J.** Diagnóstico diferencial del Cólera Porcino. Avances en enfermedades del cerdo. 1985 Editores: Correa G. P, Morilla A. y Stephano A. Pags: 89-100. Ediciones de la Asociación Mexicana de Mèdicos Veterinarios Especialistas en Cerdos. 1985.

3. **Arias I. J.** Vacuna GPE contra el Cólera Porcino. Avances en Enfermedades del Cerdo. 1985. Editores: Correa G. P., Morilla A. y Stephano A. Pags: 115-116. Ediciones de la Asociación Mexicana de Mèdicos Veterinarios Especialistas en Cerdos. 1985.

4. **Baez R., Coba A., Anaya E., Correa G., Rosales O., Angeles L.** La cepa vacunal PAV-250 contra la fiebre porcina clàsica: empleo en cerdas durante la gestaciòn y el celo. Memorias del XXVII Congreso Anual AMVEC. Pàginas: 234-237. Editores: Gòmez, M., Patròn, A., Alzina, A., Rodrìguez, J., Molina P. y Batista, L.. Asociacion Mexicana de Mèdicos Veterinarios Especialistas en Cerdos. 1992.,

5. **Coba A., Baez R., Anaya E., Correa G.** Protecciòn conferida por la vacuna contra el còlera porcino PAV-250 en lechones de 1 y 7 dìas de edad. Memorias del XXII Congreso Anual AMVEC. 1988. Editado por: Stephano, A. y Navarro, R. Pàgina 104-106. 1988.

6. **Correa P., Rodríguez B., Martínez A.** Producciòn de la vacuna PAV-250 contra el Còlera Porcino con altos tìtulos, utilizando cèlulas PK-15 libres de contaminaciòn por BVD y suero irradiado y ultrafiltrado. Memorias del Segundo Congreso Nacional AMVEC. 1984. Pàgina 7.

7. **Correa G.P.** Experiencias con los biòlogicos contra el còlera porcino. Avances en enfermedades del cerdo, 1985. Editores: Correa G.P., Morilla A. y Sthepano A. Pàgina 117-124. Ediciones de la Asociaciòn Mexicana de Mèdicos Veterinarios Especialistas en Cerdos. 1985.

8. **Correa G.P,. Ramírez R.N.** Còlera Porcino en : enfermedades de los cerdos. Editado por: Pijoan C. y Necochea R.N. Pàgina 85-101 Editorial Diana Tècnico 1987.

9. **Correa G.P.** Enfermedades vírales de los animales domèsticos (monogàstricos) volùmen 1, tèrcera ediciòn. Pàgina 7-26. Ediciòn de Autor. 1981.

10. **Correa G.P., Coba A., Anaya E., Maldonado H.** Características epizootiològicas de algunos brotes de còlera porcino ocurridos de julio de 1988 a abril de 1989. Memorias del XXIV Congreso Anual AMVEC, 1989. Editan: Lòpez, J. y Navarro, R. Pàginas 286-289. 1989.

11. **Del Río V.J.,** Campaña contra el Còlera Porcino en Mèxico en Avances de Enfermedades del Cerdo. 1985. Editores: Correa G.P. Morilla A. y Sthepano A. Pàgina 145-146. Ediciones de la Asociaciòn Mexicana de Mèdicos Veterinarios Especialistas en Cerdos. 1985.

12. **Gay G.J.,** Avances en el control y erradicaciòn de la Fiebre Porcina Clàsica en Mèxico. Memorias del primer Simposium sobre las Principales Enfermedades Nerviosas del Cerdo. Editan Santillàn, S. y Ruiz Ch., S. AMVECO. 1991.

13. **Gillespie J.H., Timoney J.F.** Enfermedades Infecciosas de los animales domèsticos (De Hagan y Bruner). Cuarta Ediciòn en español. Pàginas 636-647. Editorial la Prensa Mèdica Mexicana. 1981.

14. **Hernàndez B.E.,** Características del Virus del Còlera Porcino. Avances en enfermedades del Cerdo. 1985. Editores Correa G.P., Morilla A., y Sthepano A. Pàginas 67-69. Ediciones de la Asociaciòn Mexicana de Mèdicos Veterinarios Especialistas en Cerdos. 1985.

15. **Mora G.L.,** Normas mìnimas de la Elaboraciòn de la Vacuna contra el Còlera Porcino. Avances en enfermedades del Cerdo 1985. Editores Correa G.P., Morilla A., y Sthepano A. Pàginas 137-140. Ediciones de la Asociaciòn Mexicana de Mèdicos Veterinarios Especialistas en Cerdos. 1985.

16. **Morilla A.** Estudio sobre el comportamiento de las Vacunas Comerciales del Còlera Porcino en condiciones de campo. Avances en enfermedades del cerdo. 1985. Editores Correa G.P., Morilla A. y Sthepano A. Pàginas 125-128. Ediciones de la Asociaciòn Mexicana de Mèdicos Veterinarios Especialistas en Cerdos. 1985.

17. **Pèrez L.M.** Pruebas de Potencia para el control de Calidad de las Vacunas del Còlera Porcino. Avances en enfermedades del Cerdo. 1985. Editores: Correa G.P., Morilla A. y Sthepano A. Pàginas 141-142. Ediciones de la Asociaciòn Mexicana de Mèdicos Veterinarios Especialistas en Cerdos. 1985

18. **Ramìrez N.,R.** Algunos aspectos clìnicos del Còlera Porcino. Avances en enfermedades del Cerdo. 1985. Editores: Correa G.P., Morilla A. y Sthepano A. Pàginas 77-79. Ediciones de la Asociaciòn Mexicana de Mèdicos Veterinarios Especialistas en Cerdos. 1985.

19. **Van Oirscht J.T.** Hog Cholera in: Diseases of swine, 6th Ed., Edited by: Leman A.D., Straw B., Glock R.D., Mengeling W.L., Penny R.H.C., Scholl. E. Pags: 289-299. Iowa State Press. 1986.