

72.17.13

ESTADO DE LA AGROPECUARIO

BIBLIOTECA AGROPECUARIA DE COLOMBIA

EVALUACION DE TRES VACUNAS A VIRUS VIVO MODIFICADO
CONTRA LA PESTE PORCINA

TESIS

Presentada al Programa de Estudios para Graduados Universidad
Nacional de Colombia-Instituto Colombiano Agropecuario

por

NANCY PETRO VERGARA

Como requisito parcial para optar al grado de

MAGISTER SCIENTIAE

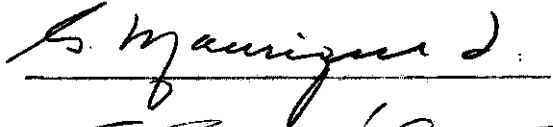
BOGOTA - COLOMBIA

1973

TESIS APROBADA POR

COMITE CONSEJERO :

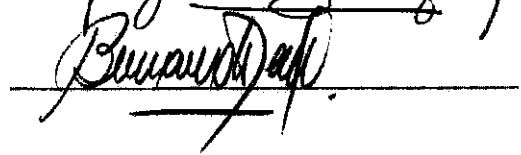
Dr. GUSTAVO MANRIQUE LONDOÑO

Handwritten signature of Gustavo Manrique Londoño in cursive script, written over a horizontal line.

Dr. GUILLERMO GONZALEZ

Handwritten signature of Guillermo Gonzalez in cursive script, written over a horizontal line.

Dr. BERNARDO PEÑA

Handwritten signature of Bernardo Peña in cursive script, written over a horizontal line.

El Presidente de tesis y el consejo examinador de grado, no serán
responsables de las ideas emitidas por el candidato
(Artículo 217 de los Estatutos de la Universidad Nacional)

A mis padres y a mis hermanos

a mis amigos

AGRADECIMIENTOS

A la Escuela para Graduados UN-ICA, por la ayuda económica que recibí durante mis estudios.

A mi comité consejero, por sus importantes aportes en la realización de mi trabajo.

A los Doctores Omar Hincapie, Alvaro Gutierrez y Olga Mariffo, por su constante dirección en la ejecución de mi trabajo.

A los Doctores Juan Edgar Villate, Mirta de Rubin, y con ellos a todo el personal del Laboratorio de Investigaciones Médicas Veterinarias, por su valiosa colaboración durante la realización de mi trabajo.

A los Doctores Ricardo Ochoa, Guillermo Mateus y con ellos a todos los profesores de la Escuela, por los muchos conocimientos recibidos.

MICROBIOGRAFIA

NANCY PETRO VERGARA, nació en Monteria, Departamento de Córdoba, el 3 de Diciembre de 1.944. Culminó sus estudios de Bachillerato en el Colegio Santa Isabel de Hungría de Bogotá, recibió el título de Licenciada en Bacteriología en el Colegio Mayor de Manizales, en 1.967.

Desde Abril de 1.968 se vinculó a la Universidad de Córdoba de Monteria, donde ocupó el cargo de Laboratorista Clínica y Bacteriología auxiliar de las asignaturas Microbiología y Laboratorio Clínico, cargo en el cual permaneció hasta su ingreso a la Escuela para graduados en Ciencias Agrarias, UN-ICA., en el programa de Microbiología.

CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCION	1
1.1. Naturaleza del problema	1
1.2. Objetivos Generales	3
2. REVISION DE LITERATURA	4
2.1. Generalidades	4
2.1.1. Características del virus	4
2.1.2. Vías de entrada, transmisión y huéspedes susceptibles	5
2.1.3. Cultivo	5
2.1.4. Diagnóstico	5
2.1.5. Epizootiología	6
2.1.6. Erradicación	7
2.2. Sistemas de Vacunación	8
2.2.1. Método simultáneo	8
2.2.1.1. Ventajas del Método simultáneo	9
2.2.1.2. Inconvenientes del Método simultá neo	9
2.2.2. Vacunas inactivadas	11

	Página
2.2.2.1. Ventajas de las vacunas <u>inacti</u> vadas	13
2.2.2.2. Inconvenientes de las vacunas inactivadas	13
2.2.3. Vacunas a virus vivo modificado	14
2.2.3.1. Requisitos de las vacunas a virus vivo modificado	17
2.2.3.2. Datos sobre experimentos con <u>va</u> cunas a virus vivo modificado contra la Peste porcina	18
2.2.3.3. Ventajas de las vacunas a virus vivo modificado contra la Peste porcina	22
2.2.3.4. Inconvenientes de las vacunas a virus vivo modificado contra la Peste porcina	24
2.2.4. Suero hiperinmune	27

	Página
2.3. Acción de los anticuerpos pasivos maternos sobre el proceso de inmunización	28
2.4. Fracasos a corto plazo de la vacunación	29
2.5. Factores que interfieren con el proceso de inmu- nización	31
3. MATERIALES Y METODOS	34
3.1. Lugar de ejecución	34
3.2. Desarrollo de la investigación	34
3.2.1. Animales de experimentación	34
3.2.2. Vacunas	34
3.2.3. Diseño experimental	35
3.2.4. Prueba de titulación de las vacunas	37
3.2.5. Prueba de esterilidad de las vacunas	37
3.2.6. Prueba de inocuidad de las vacunas	37
3.2.7. Prueba de eficacia de las vacunas	38
3.2.7.1. Titulación del virus de descarga por prueba de inmunofluorescencia..	38
3.2.7.2. Realización y lectura de la prue- ba de eficacia	40

	Página
3.2.7.3. Recolección de las muestras para la determinación de los títulos de anticuerpos	40
3.2.7.4. Determinación del título de anticuerpos conferidos por las vacunas	41
3.2.7.5. Prueba de seroneutralización para determinar el título de anticuerpos conferidos por las vacunas	44
4. RESULTADOS Y DISCUSION	46
5. CONCLUSIONES	60
6. RESUMEN	63
7. SUMMARY	64
BIBLIOGRAFIA	66

LISTA DE FIGURAS

Número	Página
1. Lesiones cutáneas en un cerdo afectado de Peste porcina	51
2. Lesiones macroscópicas de Peste porcina en riñon, cerebro y páncreas	51
3. Lesiones macroscópicas de Peste porcina en ganglios linfáticos, cerebro e hígado	52
4. Temperatura promedio de las cerdos vacunados con las vacunas, Cepa China, Duvaxyn y Cerdo Virac	53
5. Temperatura promedio observada en los cerdos vacunados durante 10 días después de inoculados con 10.000 DI ₅₀ de virus virulento	54

Número	Página
6. Temperatura promedio observada en los cerdos con troles después de inoculados con 10.000 DI ₅₀ de virus virulento de la Peste porcina	55
7. Suero negativo a prueba de seroneutralización ..	59
8. Suero positivo a la prueba de inmunofluorescen cia indirecta	59

1. INTRODUCCION

1.1. NATURALEZA DEL PROBLEMA

La Peste porcina conocida también como Cólera porcino es una enfermedad septicémica altamente infecciosa, causada por un virus cuyo h_uésped natural es el cerdo y el único animal en el cual ocurre, causando un 95% de morbilidad y una mortalidad casi igualmente elevada, siendo considerada la responsable de mas muertes en comparación con las causas por otros agentes infecciosos.

Los intentos de reproducir la enfermedad en animales de laboratorio han sido infructuosos razón por la cual no son usados en el diagnóstico del virus.

En Colombia apareció por el año de 1942, hay epizootias de esa época reportadas en la Guajira, Magdalena y Chocó; parece que el contagio llegó al país por la frontera Colombo-Venezolana, mediante el transporte de cerdos. Ultimamente ha sido diagnosticada en un número considerable de cerdos de diferentes sitios presentandose por lo general en animales que no han recibido vacunación.

La Peste porcina tiene importancia en la economía del país no solo por las altas pérdidas que causa debido a los altos porcentajes de mortalidad, sino también por los costos elevados de los métodos de control adoptados para detener su extensión.

La Peste porcina no es una enfermedad importante desde el punto de

vista de zoonosis, pero debido al gran número de cerdos recuperados que existen como portadores y diseminadores de la enfermedad, a los numero sos medios de diseminación del virus y a la falta de continuas campañas de erradicación, ha sido considerada de gran importancia.

Esta enfermedad tiene además interés debido a que mientras más in tenso es el comercio con cerdos o sus carnes, más posibilidad hay de que la enfermedad se extienda en una zona porcícola. En estos casos no es po sible controlarla solo con medidas higiénicas y de pol ficia veterinaria sino que se hace imprescindible proteger a los criaderos de la zona, por medio de vacunación.

La Peste porcina es muy frecuente en el país debido a los siste mas rudimentarios de cría con mal manejo de los animales, falta de apli ción de técnicas de desparasitación o vacunación; debido a esto se ha presentado en forma relativamente alta, no solo en los departamentos que tienen el mayor número de cerdos sino en los que se abastecen de ellos, los cuales pueden tener explotaciones de tipo industrial, causando las grandes pé rdidas observadas en la industria porcina de nuestro país.

Como la Peste porcina es una enfermedad a la que están constante mente expuestos los cerdos, dada su gran facilidad de transmisión y la cual puede prevenirse pero no tratarse, es necesario mantener una pobla ción grande de cerdos con baja susceptibilidad a ella. Para llegar a ob tener esto se hace justificable un estudio del grado de resistencia con ferido por tres tipos de vacunas comerciales usadas en su prevención.

1.2. OBJETIVOS GENERALES

Determinar el título de anticuerpos desarrollados en tres lotes de cerdos, después de la vacunación con vacuna " Cepa China ", " Duvaxyn " y " Cerdo Virac ".

Evaluación del grado de eficacia de las vacunas anteriormente mencionadas, en base a la resistencia de los tres lotes de cerdos previamente vacunados, a la descarga de 10.000 DI₅₀ de virus virulento.

Comprobar si las vacunas anteriormente mencionadas son o no inocuas en base a la presencia o ausencia de graves reacciones post-vacunales o desarrollo de la enfermedad.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1. GENERALIDADES

2.1.1. Características del virus.

La Peste porcina es una enfermedad septicémica del cerdo altamente infecciosa, caracterizada por anorexia, enflaquecimiento, constipación seguida de diarrea, fiebre alta, incoordinación, coloración púrpura de las orejas y leucopenia. Es causada por un virus clasificado como Togavirus, el cual es de tipo RNA, tiene 32 capsómeros, un diámetro de 35-40 nm, nucleocápsid icosaédrico, la simetría del cápsid no es conocida, el sitio de ensamblaje del cápsid es el citoplasma, Melnick (64). Como cepas del virus, se conocen la cepa Ames y la cepa 331, las cuales no tienen diferencias antigénicas, Pirtle y Mengeling (82).

El virus de la Peste porcina está relacionado antigénicamente con el virus de la Diarrea Viral Bovina, Darbyshire (30), Pirtle y Gutkunst (81), Seffy et al. (94), en lo que respecta al tipo de ácido nucleico y densidad. Serológicamente esta relación ha sido confirmada por pruebas de difusión en gel y fijación del complemento, Darbyshire (31).

El virus de la Peste porcina es sensible al éter y cloroformo, Feldman y Stephen (43), Mckissick y Gustafson (63); es destruido por la desecación y la putrefacción; es estable a pH entre 5-10, pero es inactivado a pH 3, Dunne (35). El virus en sangre o suero con

serva su virulencia a temperatura ambiente por 10-14 semanas, Gillespie y Coggins (45).

2.1.2. Vías de entrada, transmisión y huéspedes susceptibles.

Kernkamp (56) demostró que la vía de entrada del virus es la vía digestiva y posiblemente la vía respiratoria. La transmisión de la enfermedad se hace por cualquier descarga corporal, por el transporte de cerdos infectados, por alimentos, aguas, desperdicios, y equipos contaminados, Dunne (34). Se demostró que el parásito pulmonar del cerdo Metastrongylus apri, actúa como un huésped intermediario para el virus, Bernasky y Todoroff citados por Hughes y Gustafson (52); Shope (95), Solorzano y Thigpen (99), mostraron que el piojo del cerdo Hematopinus suis, sirve como reservorio y transmisor de la enfermedad.

2.1.3. Cultivo.

La propagación in vitro del virus de la Peste porcina fue reportada primero por Hecke citado por Loan y Gustafson (60); más tarde Boynton (12), observaron que podía ser cultivado en una amplia variedad de tejidos porcinos. Según Loan y Gustafson (60), las células sanguíneas son buenas para su crecimiento; la línea celular PK15 es la más usada actualmente para la titulación del virus y pruebas de seroneutralización, Mengeling y Drake (66).

2.1.4. Diagnóstico.

El virus, según Stair et al. (101), para el diagnóstico se puede aislar de la sangre, bazo, nódulos linfáticos, tonsilas, páncreas. La prueba de anticuerpos fluorescentes se usa ampliamente en el diagnóstico, Aiken et al. (1), Carbrej et al. (18), Mengeling y Torrey (67), Mengeling et al. (68), Stair et al. (100). Esta prueba sirve además para diferenciar el virus virulento de Peste porcina, atenuado e inactivado, Aiken et al. (2), Teebken et al. (105). La prueba de fijación del complemento ha dado buenos resultados en el diagnóstico, Korn et al. (57). La detección del virus de la Peste porcina por su efecto sobre el virus de la enfermedad de Newcastle en cultivo celular porcino, es un método usado para el diagnóstico de la enfermedad, Kumagai et al. (58), Kumagai et al. (59), Matumoto et al. (62). Esta prueba esta basada en un fenómeno de exaltación de virulencia. La prueba de precipitación en gelosa también se usa con el virus Peste porcina, Coggins y Heuschele (26), Darbyshire (31), Mansi (61), Molnar (70), Pirtle (80). En el diagnóstico de la enfermedad para detectar anticuerpos se usa la prueba de seroneutralización por anticuerpos fluorescentes, Carbrej et al. (20), Coggins y Baker (23), Coggins y Sheffy (24), Robson et al. (86), Robson et al. (87), y también la prueba de inmunofluorescencia indirecta, Ressang y Den Boer (85). Este sistema permite encontrar títulos de anticuerpos vacunales y casos crónicos de la enfermedad.

2.1.5. Epizootiología.

En la epizootiología de la enfermedad se debe considerar el movimiento de cerdos infectados como la causa mayor de casos de Peste porcina, Beals et al. (9). Además de los medios conocidos de contacto directo y transmisión mecánica, los mapaches, pollos, pajaros, moscas domésticas (Tabanides sp), Hughes y Gustafson (52), Scharte (93), Tidwell et al. (108), han mostrado ser diseminadores del virus. Las vacunas a virus vivo pueden ser causa de casos de Peste porcina, el porcentaje de transmisión observado por Dunne (35) fue así: vacunas de origen de conejo 80%, vacunas de origen porcino 100%, vacunas en cultivo de tejido 69.2%.

Es importante considerar el papel de la cerda preñada vacunada en los primeros días de gestación con virus vivo modificados, ya que estas transmiten el virus a sus fetos, Carbrey et al. (19), Stewart et al. (102), Young et al. (117), los cuales por su tolerancia inmune, Carbrey (17), permanecen infectados, siendo portadores y diseminadores del virus y un peligro potencial en piaras susceptibles, Huck y Aston (50). Igual caso sucede cuando cerdas inmunes preñadas se exponen al virus virulento.

2.1.6. Erradicación.

Según Dunne (35), para la erradicación de la enfermedad en Estados Unidos se recurrió al sacrificio de los cerdos infectados, a la aplicación de medidas de cuarentena a los cerdos que iban a ser transportados y se prohibió el uso de vacunas a virus vivo viru

lento. Una fase importante en la erradicación de la enfermedad com
prendió: a) las campañas de información acerca de la gravedad de
la enfermedad y los propósitos del programa; b) las encuestas para
determinar la incidencia de la enfermedad; c) el mejoramiento y
estandarización de los sistemas de diagnósticos; d) en el control
en el movimiento interestatal de cerdos; e) el control de los vec
tores biológicos; f) estricta obligación de reportar todos los ca
sos de la enfermedad; g) control sobre la regulación de cocimiento
de desperdicios y h) el uso de sistemas de vacunación con vacunas
a virus vivo no patogénicos, no diseminantes que produjeran un al
to grado de inmunidad dando lugar a cerdos completamente refracta
rios, Mulhern (71).

2.2. SISTEMAS DE VACUNACION

Se conocen cuatro procedimientos para la protección contra la Pes
te porcina, estos son: a) metodo de inoculación simultáneo, b)
vacunación con virus inactivado, c) vacunación con virus vivo modi
ficado y d) inyección de suero hiperimmune, Fechner (42).

2.2.1. Método simultáneo.

El control de la Peste porcina por medio de vacunación empezó por
primera vez en Estados Unidos en el año de 1908, con el método de
inoculación simultáneo que consiste en la aplicación de virus viru
lento y suero hiperimmune, Dale et al. (28), Edwin (40).

Según Dunne (32) el uso excesivo de antisuero junto con el virus virulento es capaz de interferir con el desarrollo de una inmunidad activa. Dunne (34), reportó en 1966, que el empleo de una cantidad suficiente de antisuero, 1 ml. por libra de peso corporal hasta las 30 libras, junto con el virus virulento elimina practicamente la posibilidad de que el virus produzca la enfermedad.

Los títulos de anticuerpos, determinados entre los 71 y 112 días después de la vacunación con 1 ml. de antisuero en cerdas de 5-61 días de gestación, variaron de 1.8 a 3.6 logaritmos con un título medio de 2.7 logaritmos y el título en los cerditos de madres así vacunadas, determinados a los 2-4 días de amamantados, fue de 3.0 y 1.8 logaritmos respectivamente, Stewart et al. (103).

2.2.1.1. Ventajas del método simultáneo.

Este método produce inmediata y permanente inmunidad en un alto porcentaje de los animales. Se puede emplear en piaras expuestas o infectadas con Peste porcina, Bethke et al. (11). El alto grado de inmunidad conferido por el método simultáneo en relación con los grandes inconvenientes que tiene, no se puede considerar como un factor para la aplicación de este sistema.

2.2.1.2. Inconvenientes del método simultáneo.

Desde el desarrollo del método simultáneo de vacunación contra la Peste porcina por Dorset, McBryde y Niles citados por Dale et al.

(28) en 1951, este método se ha usado extensivamente en Estados Unidos y es uno de los factores responsables del gran desarrollo de la industria porcina en este país. A pesar de esto, por muchos años han ocurrido resultados desfavorables después de la vacunación. Se propusieron varias razones como causas de estas reacciones adversas comunmente conocidas como rupturas, entre ellas estan: disturbios nutricionales, el uso de suero impotente, presencia de otras enfermedades debilitantes y parasitismo. Las pérdidas posteriores a la vacunación, sufridas en el período de vacunación de los años 1949 y 1950, en el medio oeste de los Estados Unidos, las cuales alcanzaron una extensa área, se creó un considerable interés acerca de las variables del virus, pero Dale et al.

(28) demostraron que aumentando la administración de antisuero de 15 a 45 ml. se proporcionaba 100% de protección frente a tales variantes.

Entre los inconvenientes de este método esta el hecho de que crea focos de infección, produce leucopenia y agrava infecciones latentes que pueden estar presentes en los animales así tratados, Bethke et al. (11). Además, el sistema simultáneo tiene inconvenientes tales como la eliminación del virus por los animales vacunados y el alto riesgo de pérdidas post-vacunales, por lo cual esta prohibido su uso en casi todos los países, Dunne (33).

El primer reporte sobre los efectos dañinos del virus de la Peste porcina sobre el desarrollo de los fetos, en cerdas preñadas, fue hecho por Beuner citado por Stewart et al. (103) quien observó infección transplacentaria y abortos después de la vacunación con el método si

multáneo y además el virus interfirió en algunos casos con el desarrollo normal de los fetos, resultando estos momificados y parte de las camadas muertas al término de la preñez.

Stewart et al. (103) confirmaron estas anomalías en cerdas vacunadas en los primeros días de gestación, esto no lo observaron cuando aplicaron el virus con una dosis alta de antisuero y a los 48 días de gestación, lo que los llevó a decir que la dosis de antisuero y el tiempo de gestación son factores que se deben considerar.

2.2.2. Vacunas inactivadas.

Entre las vacunas preparadas con virus de la Peste porcina inactivadas, ya sea por formalina o calor, Otsuka y Terakado, citados por Fechner (42); fotodinamicamente y por adsorción en hidróxido de aluminio, Crawford y Dayhuff (27); por la acción del cristal violeta con glicerina y calor usando la cepa Washigton, Fuchs, citado por Fechner (42), o en cultivo celular, Boynton et al. (13), la que mas difusión ha tenido es la vacuna a virus inactivado con cristal violeta, la cual empezó a ser usada en 1934 en Estados Unidos. Esta vacuna y la vacuna tipo Boynton producen una inmunidad que aparece a las 2-3 semanas después de su aplicación y en un 87% de los cerdos vacunados persiste por un período de 6 meses, Edwin (40), Newberne et al. (74).

Se ha observado respuesta secundaria de anticuerpos, en cerdos va

cunados con vacunas al cristal violeta, al recibir posteriormente vacunas a virus vivo modificado, lo cual hizo pensar que sería ideal un sistema de vacunación en el cual se aplique primero una vacuna al cristal violeta y luego una revacunación con virus vivo modificado, Coggins et al. (25). Dale y Songer (29) y Dunne (33) en sus estudios sobre evaluación de la vacuna al cristal violeta glicerol (VCG) contra la Peste porcina, consideraron que para hacer tal evaluación era necesario a) historia de cría de los animales, b) un buen estado de salud, c) los cerdos deben estar libres de la infección por Salmonella choleraesuis, d) debe usarse el mismo lote de virus descarga para todas las pruebas y e) la edad de los cerdos debe ser de 4 a 8 meses de edad.

Según Carbrey et al. (20) la vacunación con vacunas inactivadas produjo títulos de anticuerpos relativamente bajos, determinados por pruebas de seroneutralización, ya que solo 3 de 12 cerdos vacunados, tuvieron títulos de anticuerpos de 0.6 logaritmos, 80 días después de aplicada la vacuna. Estas vacunas inactivadas se deben usar en las zonas infectadas de manera esporádica y en la inmunización rutinaria de los cebaderos, Van Waveren (113).

Aunque no se han observado trastornos después de la aplicación de la vacuna al cristal violeta en cerdas gestantes, Rohrer y Pehl citados por Fechner (42), Huck y Aston (50), observaron que cerdas vacunadas por este sistema y más tarde expuestas al virus virulento, parieron cerdos débiles, moribundos y muertos.

2.2.2.1. Ventajas de las vacunas inactivadas.

Estas vacunas son seguras de usar, debido a que las partículas virales están inactivadas, ellas no producen viremia por multiplicación del virus en el animal, ni pérdidas post-vacunales, debidas a diseminación de la enfermedad, tampoco producen leucopenia; Además están libres de patógenos virales o bacteriales debido al proceso de inactivación, Mott (72). Pueden ser usadas en piaras afectadas con enfermedades crónicas (enteritis, neumonía) y en animales debilitados, Bethke et al. (11). Son seguras de usar sobre cerdas preñadas, donde las vacunas a virus vivo modificado, están contraindicadas, Mott (72).

2.2.2.2. Inconvenientes de las vacunas inactivadas.

La protección determinada por sobrevivencia a pruebas de descarga con virus virulento, después de aplicación de una sola dosis de la vacuna al cristal violeta, fue inferior al 80%, Dunne (35). Estas vacunas no pueden ser administradas en casos de epizootias debido a que no pueden ser usadas simultáneamente con antisuero y el virus en los cerdos expuestos a la enfermedad puede multiplicarse antes de la aparición de la inmunidad, Mott (72). Además, no deben ser usadas en programas de erradicación ya que los cerdos así vacunados no quedan refractarios a la enfermedad, Dunne (35).

Estas vacunas inactivadas requieren mayor número de partículas

virales por dosis, debido a que estas no se multiplican en el animal, como sucede con el virus de las vacunas vivas modificadas, Mott (72).

Cerdos vacunados con estas vacunas inactivadas y posteriormente infectados con virus virulento quedan como diseminadores del virus aunque la enfermedad no sea clínicamente detectada en ellos, en caso de que sean cerdas preñadas, sus fetos también quedan como focos de infección, Dunne (35).

Según Carbrey et al. (20), la vacunación con vacunas inactivadas produce una respuesta inmune muy débil, la rata de inmunidad conferida por estas vacunas es más baja que la producida por las vacunas a virus vivo modificado y a la vez menos duradera, Mott (72).

2.2.3. Vacunas a virus vivo modificado.

La atenuación de las propiedades patogénicas de un virus se puede conseguir por diversos procedimientos, pero para ser útil como vacuna no debe disminuir sus características productoras de anticuerpos, Dunne (34).

Las vacunas a virus vivo modificado contra la Peste porcina, empezaron a ser usadas por primera vez en Estados Unidos en el año 1957, Edwin (40). Este método de vacunación utiliza las vacunas preparadas con virus vivo modificado ya por pasajes en co

nejos, Baker (6), por pasajes en cerdos, Mott (72), o por pasajes en cultivo de tejido, Boynton et al. (113), Ose et al. (75). El crecimiento y atenuación del virus de la Peste porcina en cultivo celular, resultó en el desarrollo de vacunas en cultivo de tejido, usando riñon porcino como células básicas para su preparación, Bass y Ray (8), Goret et al. (47), Torlone y Tito li (109), Torlone et al. (112).

En Bogotá (Colombia) se esta preparando comercialmente en la Empresa Colombiana de Productos Veterinarios (VECOL), una vacuna a virus vivo modificado contra la Peste porcina la cual es conocida como "Cepa China" con esta cepa china del virus de la Peste porcina pase 2 Bogotá 1970, modificada en conejo, procedente del Instituto Zooprofiláctico de Brescia Italia, la cual se cree que es de origen Americano, Parra (76). El título del producto liofilizado es de $10^{3.2} - 10^{3.5}$ en conejos, por dosis vacunal, que conservados en refrigeración se mantienen sin pérdida del título hasta por 12 meses. Para su uso no requiere la administración simultánea de antisuero, Parra (76).

Entre otros tipos de vacunas, esta la vacuna Swivax, producida por Pitman Moore, preparada con virus de la Peste porcina modificado. Los estudios de Newberne et al. (74), Yohnston (114), de mostraron que este virus vacunal produce una sólida inmunidad en los cerdos, ya sea aplicado solo o simultáneamente con antisuero, sin persistir en ellos, ni revertir a virulencia.

Otra vacuna a virus vivo modificado es la vacuna Rovac, distribuida por Laboratorios Cyanamid, contra la Peste porcina, es preparada a partir de órganos de conejos infectados con el virus después de haber sufrido 200 pasajes en conejos, Merchant y Parker (69).

Las primeras pruebas sobre el uso del virus de la Diarrea Viral Bovina (BVD) parecieron promisorias, Atkinson et al. (3), Baker et al. (7). Este virus tiene una relación serológica con el virus de la Peste porcina, Darbyshire (30), y se empleó como una vacuna heterotípica contra la Peste porcina, usando cepa A virulenta de Cornell y cepa Oregon C 24 V como virus vacunal. Sin embargo en pruebas de eficacia posteriores usando virus virulento, la vacuna falló en proporcionar adecuada protección, Tamoglia et al. (104). La experiencia de Simongi (96) y Zuffa et al. (118) sugirió que el virus BVD Oregon C 24 o UG 59 usado como vacunas, no protegen contra el virus virulento de la Peste porcina.

Goret et al. (47), comprobaron la inocuidad y eficacia de una vacuna modificada contra la Peste porcina, preparada a partir de Cepa China CL (Chinoise Lyon) propagada en cultivo de células renales de cordero, después de haber sufrido 17 pasajes consecutivos. Los animales vacunados mostraron estar inmunes a descargas hechas con 10^6 dosis letales de virus virulento. Sasahara citado por Aynaud et al. (5), demostró que el virus de la Peste

porcina se puede cultivar y desarrollar in vitro a bajas temperaturas (30°C). Según Nobuto citado por Aynaud et al. (5), después de 170 pasajes del virus de la Peste porcina en cultivo celular a 30°C de temperatura seguido de clonajes, se obtienen cepas que han perdido su poder patógeno para el cerdo y que pueden ser usadas como vacunas vivas. Estas cepas se denominan " Mutantes Frias " o Cepa Thivernal, y tienen una multiplicación limitada en el organismo animal por razón de la temperatura corporal elevada del cerdo 39.5°C y a la vez, por ser frágiles al calor, no se pueden difundir de cerdo a cerdo Aynaud et al. (5), estudiando esta vacuna viva encontraron que era inocua para el cerdo a dosis de $10^2 - 10^6$ unidades formantes de placas, (UFP), y que producía una inmunidad capaz de proteger contra descargas con 10^6 dosis infectantes de virus. Este tipo de vacuna se halla todavía en experimentación.

2.2.3.1. Requisitos de las vacunas a virus vivo modificado.

Según York (115) las vacunas a virus vivo modificado deben llenar los siguientes requisitos:

a) En cuanto a inmunidad.

- 1) Producir un 90% o más de respuesta en los cerdos vacunados.
- 2) El cerdo vacunado debe quedar refractario a la enfermedad o sea, no debe ser susceptible al desarrollo de una infección aun de bajo grado.

- 3) Producir inmunidad a partir de 4-7 días después de la vacunación.
 - 4) La inmunidad conferida por ella debe ser de larga duración, no menor de 12 meses.
- b) En cuanto a seguridad.
- 1) No inducir evidencia clínica o patológica de la enfermedad aun cuando la vacuna sea usada sin antisuero.
 - 2) No causar enfermedad por contacto a cerdos susceptibles.
 - 3) No crear en los animales vacunados un estado de portador del virus.

El criterio para considerar una vacuna como inocua es que no produzca síntomas de Peste porcina, tales como elevación de temperatura, inapetencia, muerte o la presencia de lesiones de Peste porcina a la necropsia, Phillips (78). El control de inocuidad de las vacunas a virus vivo modificado contra la Peste porcina, particularmente en lo que concierne a poner en evidencia su virulencia residual, se haya a menudo enfrentada con numerosas dificultades. Cuando las vacunas modificadas por los más diversos procedimientos, son utilizadas en explotaciones en cerdos débiles o con bajas defensas, debido a transporte o cambio de alimentación, no es raro observar la evolución de una Peste porcina de origen vacunal que por los signos revele una infección debida al virus de campo, Florent et al. (44).

2.2.3.2. Datos sobre experimentos con vacunas a virus vivo modificado

contra la Peste porcina.

La vacuna Rovac contra la Peste porcina, a virus vivo modificado en conejo, experimentalmente ha mostrado producir alguna protección con la aplicación de una sola dosis cuando es usada un día después de exposición al virus virulento de Peste porcina y producir completa protección en todos los animales a partir del 5^o día post-vacunación, Harvey y Cooper (48).

Las vacunas a virus vivo modificado en conejo preparadas con "Cepa China", han mostrado carecer de virulencia por lo cual son más sensibles a los anticuerpos específicos y deben ser administradas sin antisuero y nunca en cerdos menores de tres meses. La inmunidad conferida por ellas es sólida y durable, pudiendo proteger por 3-4 años, Goret (46). Esta inmunidad es completa a partir del 7^o día después de la vacunación, probado por resistencia de los animales a descargas con virus virulento en dosis superiores a 10^6 dosis letal 50 (DL50). Florent et al. (44) utilizando la prueba de inmunodepresión a la prednisolona para poner de manifiesto la virulencia residual para el cerdo, de diversas vacunas comerciales (Cepa China, Hudson y Rovac), mostraron que únicamente la Cepa China fue incapaz de provocar en los cerdos sometidos a la prueba, la evolución de manifestaciones patológicas de Peste porcina o muerte; las demás vacunas probadas produjeron mortalidades consideradas en un 50-70%, según el lote, siendo mayor para la vacuna Rovac. En Bélgica se descarta el uso de toda vacuna

capaz de producir Peste porcina vacunal comprobado ya por inmuno de pre si o en cerdos débiles con bajas defensas producidas por stress, Bran et al. (14), Torlone et al. (110), Torlone et al. (111).

Estas vacunas a base de Cepa China, modificada en conejos, por prueba de inocuidad, no han mostrado efectos desfavorables sobre cerdas preñadas o fecundidad de los verracos, Bran et al. (14), Torlone et al. (111).

Torlone et al. (110), en su trabajo experimental con estas vacunas en lo referente a anticuerpos neutralizantes, observaron por pruebas de seroneutralización, que ninguno de los cerdos vacunados tenían anticuerpos contra la Peste porcina antes de la vacunación, a los 12 días todos presentaron títulos de anticuerpos de 1:32 y este título fue aumentando progresivamente hacia el último control efectuado a los 12 meses después de vacunados.

Las vacunas contra la Peste porcina a base de virus lapinizado (modificado en conejo), producen un estado inmunitario muy precoz. La literatura de los diversos productos señala que la inmunidad se desarrolla entre 4-7 días. Después de un estudio sobre la rapidez de la respuesta inmunológica al virus lapinizado, se ha considerado que este estado de resistencia tan precoz no obedece propiamente a inmunidad, sino que es expresión de un estado de interferencia entre el virus lapinizado y el virus virulento con probable producción de "interferones". La cepa Hudson del virus de la Peste porcina lapinizado, usada en la preparación

después de 685 pasajes, produce a las 5 horas post-vacunación un estado de interferencia con el virus Peste porcina virulento, que permite cohabitar a los cerdos vacunados con cerdos enfermos sin que un alto porcentaje de ellos adquiriera la enfermedad. Esta interferencia también se establece en un alto porcentaje en cerdos que se vacunan en el momento de cohabitar con animales enfermos, Schmidt (93). Anteriormente Harvey y Cooper (48), en 1954 habían manifestado que esta resistencia precoz desarrollada por las vacunas lapinizadas tenía la apariencia de un fenómeno de interferencia viral.

La vacuna a virus vivo modificado contra la Peste porcina preparada con la cepa A, por Bass y Ray (8), en cultivo de células renales de embrión porcino, no mostró reversión a virulencia ni diseminación del virus, a la vez que produjo completa protección a partir del tercer día post-vacunación. Carbrej *et al.* (20), observaron títulos de anticuerpos a la dilución 1:256 en 20 cerdas susceptibles, vacunadas con dos tipos de vacunas a virus vivo modificado contra la Peste porcina en cultivo celular, lo cual es una indicación de un alto grado de inmunidad activa, además no observaron diferencias en los títulos de anticuerpos determinados a los 35 o 95 días post-vacunación. Los títulos de anticuerpos de los cerdos vacunados que 4 meses después recibieron descargas con virus virulento aumentaron de un título promedio de 1.8 logaritmos a un título promedio de 2.6 logaritmos. Estos títulos de anticuerpos después de la aplica

ción de este sistema de vacunación persistieron por 2-3 años, sin reporte de infección posterior, con alguna diferencia en los títulos atribuida a reacción individual de los cerdos a la resta a las vacunas, Carbrey et al. (20).

Los títulos de anticuerpos determinados entre los 35 y 95 días después de la vacunación de cerdas entre los 49 y 90 días de gestación, con vacunas a base de virus de la Peste porcina, modificado en cultivo celular, variaron de 1.8 a 3.0 logaritmos con un título promedio de 2.4 logaritmos. Los títulos de anticuerpos en los cerditos nacidos de estas cerdas así vacunadas, determinados entre los 8 y 21 días de nacidos fueron más bajos que los observados en sus madres, Stewart et al. (103).

Precausta et al. (83), observaron que la " Cepa China " propagada y modificada en cultivo primario de riñon de cordero usada como vacuna, confiere una inmunidad más débil cuando se aplica bajo la forma de serovacunación que cuando se aplica sola, debido a que con la serovacunación se produce una neutralización parcial del virus vacunal, lo cual puede ser origen de pérdidas, por la ausencia de inmunidad activa. Por lo tanto, esta vacuna debe ser aplicada sin antisuero y en cerdos libres de anticuerpos pasivos.

2.2.3.3. Ventájas de las vacunas a virus vivo modificado contra la Peste porcina.

Las vacunas a virus vivo modificado establecen una rápida pro

tección, lo cual hace que cerdos expuestos al virus virulento un día antes de la vacunación sean capaces de resistir la enfermedad, aunque en estos casos exista el peligro de exposición al virus, se recomienda aplicar la vacuna con antisuero, Harvey y Cooper (48).

Sanders et al. (90), sugieren que la vacunación simultánea con vacuna a virus vivo modificado y antisuero en cerdos que van a ser transportados, es preferible a la práctica de dar antisuero solo, ya que esto puede llevar a rupturas de inmunidad, si tales animales son posteriormente vacunados con vacunas a virus vivo modificado al llegar al sitio de descargue. Según Kenneth et al. (55), no hay evidencia de que el virus vacunal vivo modificado se disemine de cerdos vacunados a cerdos no vacunados en contacto.

Debido a que las vacunas a virus vivo modificado contra la Peste porcina desarrollan una rápida inmunidad contra la enfermedad, estos productos juegan un papel importante en los programas de erradicación Dunne (33).

Según Draguer citado por Fechner (42), no se ha observado una posible reactivación de la virulencia del virus vacunal vivo modificado después de varios pasajes ininterrumpidos por cerdos susceptibles.

La inmunización activa contra la Peste porcina esta basada en

la actualidad casi exclusivamente en el empleo de vacunas a vi
rus vivo modificado, Aynaud y Asso (4), Bass y Ray (8), Florent
et al. (44), Hudson (51), Sampson et al. (89).

2.2.3.4. Inconvenientes de las vacunas a virus vivo modificado contra la Peste porcina.

Van Waveren (113), encontró que una vacuna a base de virus lapi
nizado era altamente patógena para cerdos menores de dos semanas
de edad y que el uso simultáneo de antisuero no reducía esta pa
togenecidad.

La buena efectividad de las vacunas a virus vivo modificado tie
ne como oponentes, los inconvenientes debidos a las reacciones
post-vacunales y a la falta de inocuidad para cerdas gestantes.
Por ello estas vacunaciones solo son recomendadas en los países
fuertemente infectados, Van Waveren (113).

Según Kenneth et al. (55), la vacuna a base de virus lapinizado
aplicada en dosis de 1 ml. en cerditos recién nacidos amamanta
dos por madres inmunes, no producen enfermedad, pero confiere
una débil inmunidad, la cual va disminuyendo rápidamente con la
edad y no es suficiente para prevenir reacciones graves o muer
tes por descargas del virus virulento. También en 1962 Kenneth
y Sanger (54) mostraron que la aplicación de 2 ml. de la vacuna
anteriormente mencionada, producía una resistencia capaz de pro
teger contra descargas hechas 120 días después de la vacunación,

pero no 154 días después, o sea que la inmunidad conferida también era de corta duración.

Estudios reportados por Carbrey et al. (18), Dunne y Clark (37), Emerson y Delez (41), Schartz et al. (92), Young (116), describen ciertas anormalidades en cerdos nacidos de madres vacunadas a los 10 o 16 días de gestación, con vacunas lapinizadas junto con antisuero. Esas son: momificación, cerdos débiles y malformaciones, fluidos en las cavidades corporales, edema generalizado. Además esta vacuna usada a la dosis recomendada para la vacunación de rutina, causó muerte o enfermedad grave en un 10-20% cuando se aplicó en cerdos de 12 días de edad. Igual efecto era producido por la vacuna de origen porcino y por las vacunas a virus vivo modificado en cultivo celular de riñón porcino.

Según Hanser citado por Fechner (42), el virus modificado se elimina por los animales vacunados y si este virus es tomado por animales no vacunados en estrecho contacto con ellos, puede producir una débil inmunidad, la cual hace que los animales no presenten síntomas de enfermedad frente a una exposición posterior al virus, pero quedan como eliminadores o portadores.

Tomesen et al. citados por Fechner (42), han comprobado en la práctica, que en una parte de los animales inoculados con vacunas a virus vivo modificado, se originan violentas reacciones en forma de fiebre y síntomas clínicos de la enfermedad,

con un determinado porcentaje de casos mortales. Además, en los animales inoculados son frecuentes los procesos infecciosos bacterianos, lo cual es causado por el descenso de leucocitos durante 4 a 6 días después de la vacunación.

Según Solorzano y Thigpen (99), en Georgia, 17 de 31 casos de Peste porcina, fueron asociados con la vacunación con virus vivo modificado y como resultado de éstas observaciones el uso de este tipo de vacunas fue descontinuado en este estado.

Pilchard (79), en su trabajo observó hemorragias de los nódulos linfáticos, petequias en la mucosa de la vejiga urinaria, meningoencefalitis no supurativa e infiltración de células redondas en los plejos coroideos, lo cual ocurrió en 13 de 16 cerdos después de la aplicación de vacunas a virus vivo modificado. Estas lesiones fueron indistinguibles de las encontradas en cerdos infectados con virus totalmente virulento. Sin embargo los cerdos vacunados estuvieron clínicamente sanos, no presentaron leucopenia ni temperaturas elevadas; la ocurrencia de meningoencefalitis no supurativa, infiltración de los plejos coroideos por células linfocíticas y macrófagos y pruebas de anticuerpos fluorescentes en cerdos que se les dió vacunas vivas modificadas, pueden causar dificultad en hacer un diagnóstico de Peste porcina basado solo sobre los hallazgos histopatológicos y la prueba de anticuerpos fluorescentes.

2.2.4. Suero hiperimmune.

Según Fechner (42), el uso de suero hiperimmune contra la Peste porcina fue introducido en Alemania por Uhlenhuth después de haber sido demostrado que el suero de animales convalescientes produce en los cerdos sanos una defensa frente a las infecciones naturales. Este antisuero se obtiene a partir de cerdos, ya que ninguna otra especie animal es apropiada para ello, usando como antígeno sangre con virus, la cual se administra siempre por vía endovenosa, aplicando al cerdo después de vacunado una dosis de 1.000 ml. de sangre con virus, con esta dosis se obtienen resultados análogos a los que se obtiene después de largo tiempo con una inmunización de desarrollo lento.

Según Carbrey et al. (20) y Fechner (42), el antisuero Peste porcina se utiliza preferentemente en casos de transporte, traslados y exposición de cerdos. La inmunidad dura 10 a 15 días; los animales quedan protegidos durante este tiempo frente a la enfermedad, pero no obstante, la inmunidad pasiva no basta para contrarrestar el virus en infecciones masivas, por lo que puede llegarse a una eliminación de virus o hasta a una infección latente, por ello los animales que han recibido el antisuero, después del transporte o exposiciones no deben ser nuevamente alojados sin pasar la cuarentena.

Otro uso del antisuero es la aplicación en anillo alrededor de

la piara infectada; solo han de tratarse las porquerizas sanas y todavía no contagiadas.

Según Roher citado por Fechner (42), las inyecciones de antisuero en casos de urgencia en explotaciones ya infectadas puede limitar momentáneamente las pérdidas, pero a pesar de la inmunidad pasiva una parte de los animales aparentemente sanos se convierten en portadores con lo cual el efectivo mantiene la infección crónica con una fuente de virus desconocida. Por este motivo hay que evitar la aplicación de antisuero con fines curativos.

Dunne (34), Dunne y Alibasoglu (36), en sus experimentos observaron que un 50% de los cerdos tratados con suero inmune 10 a 20 días antes de la vacunación con vacunas a virus vivo modificado, fueron susceptibles y murieron cuando fueron descargados con virus virulento 8 semanas después de la vacunación. Anteriormente en 1962 Carmichael et al. (21), habían demostrado que estos anticuerpos pasivos impedian el desarrollo de una inmunización activa con vacunas a virus vivo modificado.

2.3. ACCION DE LOS ANTICUERPOS PASIVOS MATERNOS SOBRE EL PROCESO DE INMUNIZACION

Nelson (73), demostró que la transmisión de los anticuerpos maternos a los cerditos se hacia a traves del calostro. Smith y King (98), demostraron la presencia de anticuerpos pasivos hasta la cuarta semana de edad en cerdos amamantados por madres

vacunadas con vacunas a virus vivo modificado; estos cerdos tenían una protección mas corta contra la enfermedad después de destetados que los amamantados de madres inmunizadas con el método simultáneo virus virulento y antisuero.

Según Carmichael et al. (21), cuando la inmunidad presenta un alto nivel de anticuerpos pasivos, se disminuye notablemente la respuesta inmunológica activa inducida por las vacunas a virus vivo modificado, debido a que estos anticuerpos neutralizan la multiplicación del virus en el cuerpo. Coggins (22), demostró que se requieren mas de 100 veces la dosis de virus vacunal para inmunizar cerdos con anticuerpos pasivos que los requeridos para inmunizar cerdos libres de ellos. Kenneth y King (53), reportaron que los cerditos amamantados por madres inmunes, eran resistentes temporalmente a la enfermedad. Coggins (22) y Carbrey et al. (20), observaron por pruebas de seroneutralización, títulos de anticuerpos en cerditos iguales a los encontrados en sus madres, después de 24 horas de amamantados y que estos anticuerpos declinaban a la razón de la mitad por cada 13 días.

2.4. FRACASOS A CORTO PLAZO DE LA VACUNACION

Cuando los cerdos enferman dentro de los 10 días siguientes a la vacunación, se dice que se ha observado un fracaso a corto plazo. La causa más común de los fracasos a corto plazo en los cerdos vacunados con vacunas a virus vivo modificado, es la existen

cia de la enfermedad en el rebaño, por lo menos cuatro días an
tes de la vacunación. Si el primer cerdo infectado ha estado clí
nicamente enfermo menos de cuatro días, es posible que ninguno
de los cerdos restantes enfermen después de la vacunación. Por
el contrario, si el virus ha sido exparcido por el cerdo enfer
mo durante más de cuatro días, algunos de los cerdos expuestos,
sino todos, enfermarán y morirán después de la vacunación. Los
primeros cerdos enfermarán y morirán dentro de los ocho días
que siguen a la vacunación, en este período las pérdidas inclui
rán más de un cerdo. El antisuero administrado en el tiempo de
vacunación no podrá ser efectivo frente una infección estableci
da 5 a 6 días antes de su administración, Dunne (32).

La reversión de la vacuna puede ser otra causa del fracaso a
corto plazo de la vacunación, Torrey et al. citados por Dunne
(32). La verdadera reversión a la patogenicidad del virus de
una vacuna, como se observa en el campo, se caracteriza por al
gunas peculiaridades, por ejemplo; a) algunos de los cerdos que
enferman se restablecen, la administración de antisuero aumenta
estas recuperaciones; b) la enfermedad puede seguir un curso
crónico en muchos cerdos; y c) los intentos de reproducir la
la enfermedad en cerdos susceptibles a la Peste porcina general
mente se logra, pero la enfermedad puede ser crónica o los cerdos
pueden sufrir la enfermedad en forma aguda y restablecerse.

Además de los fracasos a corto plazo por vacunación, existen

los denominados fracasos a largo plazo, los cuales ocurren cuando la inmunidad pasiva conferida por el antisuero administrado durante la vacunación, se agota y cuando la producción activa de anticuerpos no ha sido estimulada, Dunne (32). La exposición del cerdo al virus de la Peste porcina, cuando se ha producido el agotamiento de los anticuerpos trae casi siempre como consecuencia la infección y la muerte, Dunne (32). La enfermedad se observa con frecuencia algunas semanas después de la vacunación, pero puede ocurrir dentro de las cuatro semanas después de ésta. La producción activa de anticuerpos es bloqueada por la presencia de anticuerpos por pre-tratamiento con antisuero, y debidos a la adsorción de anticuerpos maternos de una cerda inmune a la Peste porcina, Dunne (32).

2.5. FACTORES QUE INTERFIEREN CON EL PROCESO DE INMUNIZACION

Desde 1916 se conoce que la inmunidad producida por las vacunas contra la Peste porcina, puede ser disminuida por varios factores presentes al tiempo de la vacunación, lo cual causa problemas post-vacunales como los mostrados al estudiar epizootias presentadas en criaderos que habian sido vacunados, Hell (49).

Según Cannon (16), Rodabaugh et al. (88), Smith (97), la baja ración proteica es el factor que mas disminuye la respuesta inmunitaria.

Sprum y Flanigan citados por Dunne (34), pensaron que tanto la

la proporción, como el nivel en que se establece la deficiencia proteica eran importantes para alterar el mecanismo inmunitario.

Otro factor que disminuye la respuesta inmunitaria conferida por la vacunación es la presencia de infección simultánea o previa con bacterias patógenas. La infección con Salmonella choleraesuis, anterior a la vacunación contra la Peste porcina, aumenta la susceptibilidad de los cerdos a la enfermedad, Hughes y Gustafson (52), Rodabaugh et al. (88). Algunos otros organismos como Erysipelothrix rhusiopathie, Pasteurella multocida, Streptococcus sp., Clostridium botulinum, Listeria monocytogenes, Pseudomona aeruginosa, también pueden estar involucrados en un asalto simultáneo sobre los mecanismos de defensa del animal, Graham, Scott, Rhoades y Sutherland, citados por Dunne (34). Cuando esto sucede, el sistema productor de la inmunidad del animal es incapaz de hacer frente a dos infecciones a la vez.

Se cree que cepas variantes de virus inmunológicamente diferentes a las usadas en la producción de la vacuna, sea otro factor que contribuye a causar falla en la producción de inmunidad y con ello pérdidas post-vacunales, Dale et al. (28), Dunne et al. (38), Scharte (91).

Una disminución en el título de inmunización de la vacuna puede ser producido por ciertos factores que reduzcan el número de las partículas viables del virus en ella, tales como la exposición de esta a altas temperaturas, o la dilución excesiva de la misma,

Dunne (32).

La inmunidad conferida por vacunas a virus vivos modificados ya de altos pasajes en conejos de origen de cultivo celular, o de origen porcino, puede ser reducida por la acción interfe_rente del antisuero si se aplica después de un día y antes de 7 días después de la administración de este, Brueckener et al. (15), Dunne (34), Sanders et al. (90). El antisuero contra la Peste porcina administrado poco antes o simultáneamente con las vacunas a virus vivo modificado bloquea por 30 días los intentos para producir una inmunidad activa ocasionando un 85% de muer_tes en los cerdos así tratados, Dunne y Alibasoglu (36).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. LUGAR DE EJECUCION

Esta investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigaciones Médicas Veterinarias, I.I.M.V., de Bogotá, del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA).

3.2. DESARROLLO DE LA INVESTIGACION

3.2.1. Animales de experimentación.

En la realización de este trabajo se utilizó un total de 40 cerdos de los cuales, 6 se usaron para reproducir la enfermedad con el fin de obtener virus virulento, y los 34 cerdos restantes se usaron para las pruebas de inocuidad y eficacia. Estos cerdos eran de raza Duroc Yersey, de 1 1/2 a 2 meses de edad, con un peso promedio de 20 a 30 kg, los cuales fueron suministrados por la sección de porcinos de la Granja Experimental Tibaitatá del ICA y procedían de cerdas libres de la infección, y no estaban inmunizados contra la Peste porcina. Para evitar la presencia de anticuerpos maternos, los cerdos entraron al experimento un mes después de destetados, período que a la vez sirvió para comprobar el estado de salud de los animales. Durante este tiempo los animales fueron mantenidos en compartimientos en el LIMV, con buenas condiciones de manejo y alimentación, a la vez se les hizo análisis coprológicos y la respectiva desparasitación.

3.2.2. Vacunas.

Las vacunas usadas en este trabajo para comprobar su inocuidad

y eficacia fueron: la vacuna " Cepa China ", la vacuna " Duvaxyn " y la vacuna " Cerdo Virac ". Todas estas vacunas estan siendo usadas y vendidas comercialmente para el control de la Peste porcina en Colombia.

La vacuna Cepa China* a virus vivo modificado contra la Peste porcina, es preparada con Cepa China del mismo virus, modificada en conejos; para su administraci3n no requiere la aplicaci3n simult3nea de antisuero. La vacuna usada perteneci3 al lote No 026.

La vacuna Duvaxyn** a virus vivo modificado, preparada con Cepa Kubin del virus de la Peste porcina. Seg3n la referencia de venta sirve para vacunar cerdos sanos de todas las edades a partir de la 2^a semana de edad. A los 7 d3as despu3s de la aplicaci3n confiere una inmunidad de una duraci3n m3nima de un a3o. La administraci3n de esta vacuna no requiere la aplicaci3n simult3nea de antisuero. La vacuna usada perteneci3 al lote No Z00914.

La vacuna Cerdo Virac*** a virus vivo contra la Peste porcina, modificada por pasajes en conejos. No requiere para su administraci3n el uso simult3neo de antisuero. La vacuna usada perteneci3 al lote No P024CF.

3.2.3. Dise3o experimental.

Los cerdos se repartieron en tres grupos de 10 animales cada uno

* Producida por Laboratorios VECOL-Bogot3, Colombia.

** Distribuida por Phillips-Duphar, Amsterdam, Holland.

*** Producida por Laboratorios Life. Quito, Ecuador.

para hacer las pruebas de inocuidad y eficacia de cada una de las tres vacunas a examinar. Se dejó un cuarto grupo de cerdos escogidos al azar como control. Los tres grupos de cerdos a vacunar fueron mantenidos en cuartos independientes, en condiciones de semiaislamiento, separados a cierta distancia el uno del otro. El grupo de cerdos control se dejó en un sitio aparte.

Después del mes de observación, los tres grupos de cerdos se vacunaron, el primer grupo con la vacuna "Cepa China", siguiendo las instrucciones de la casa productora: se aplicó una dosis de 2 ml. por vía intramuscular en la cara interna de la pierna, sin usar desinfectantes para evitar la inactivación de la misma. El segundo grupo fue vacunado con la vacuna "Duvaxyn", siguiendo las indicaciones de la casa productora; se aplicó una dosis de 2 ml. por vía intramuscular. El tercer grupo fue vacunado con la vacuna "Cerdo Virac", se aplicó una dosis de 2 ml. por vía intramuscular, siguiendo las indicaciones de la casa productora.

Los cuatro cerdos controles no fueron vacunados.

Antes de la vacunación se tomaron muestras de sangre a todos los cerdos tanto los que iban a recibir las vacunas como a los controles, para comprobar la ausencia de anticuerpos contra la Peste porcina. Para ello se extrajo 10 ml. de sangre a cada cerdo la cual se recolectó en forma estéril en tubos de ensayo debidamente numerados, sin anticoagulante, se separó el suero por centrifugación a 900 g por 10 minutos. Este suero se envasó en viales individuales debidamente

numerados y se conservó en congelación a -20°C hasta el momento de la prueba.

3.2.4. Prueba de titulación de las vacunas.

Para la titulación de las vacunas se hicieron diluciones logaritmicas de base 10, desde 10^{-1} hasta 10^{-4} , usando medio minimo esencial (MEM)* como líquido diluyente. Por cada dilución se usaron cuatro conejos; la dosis de inoculación fue 1 ml. por vía endovenosa por conejo. La respuesta a la infección se manifestó por elevación de temperatura durante un período de 120-160 horas. La dosis infectante (DI₅₀) se determinó por el método de Reed y Muench (84).

3.2.5. Prueba de esterilidad de las vacunas.

Se tomó en forma estéril una asada de cada una de las vacunas y se sembró independientemente en cada una de dos placas de agar y dos tubos con medio thioglicolato. Las placas y los tubos se incubaron a 37°C y se examinaron a las 24-48 horas para ver la presencia o ausencia de contaminantes bacteriales.

3.2.6. Prueba de inocuidad de las vacunas.

A los 30 cerdos vacunados se les tomó la temperatura corporal dos veces al día por un período de 10 días. Se observó la reacción clínica

* Grand Island Biological, Grand Island, New York.

nica de los animales por cuatro semanas; una vacuna se considera inocua cuando todos los animales en cada grupo a examinar, conservaron buen estado de salud y, no mostraron síntomas de Peste porcina y solo exhiben un leve aumento de temperatura 0.1°C , Fechner (42).

3.2.7. Prueba de eficacia de las vacunas.

El virus virulento usado en esta prueba para comprobar la eficacia de las vacunas, fue 1 ml. de suero sanguíneo conteniendo 10.000 DI_{50} de virus en cultivo celular. Esta cantidad se calculó por titulación de un suero obtenido de un cerdo en fase de viremia, cuando alcanzó una temperatura corporal de 41.5°C al 5^o día después de inoculado con 1 ml. de sangre desfibrinada completa, conteniendo virus virulento. Este suero con título viral $10^{-3.26}$ DI_{50} fue distribuido en viales en cantidades de 1 ml. y conservado en congelación a -70°C , hasta el momento de su uso. El título infectante del virus fue determinado por el método de placas fluorescentes y el calculo de las DI_{50} en cultivo celular fue hecho por el método de Reed y Muench (84).

3.2.7.1. Titulación del virus de descarga por prueba de inmunofluorescencia.

Se siguió la técnica descrita por Mengeling et al. (68); se utilizaron las células de la línea celular PK15, cultivadas sobre láminas cubreobjetos de 32 x 10 mm, mantenidas en tubos Leighton, usando como medio de mantenimiento el medio mínimo esencial con sales de Hanks, adicionado de 0.5% de lactoalbúmina hidrolizada, 10% de suero porcino o bovino libre de anticuerpos contra la Peste por

cina, 100 UI/ml de penicilina, 100 mgr/ml de estreptomicina, 50 u/ml de micostatin.

Los cubreobjetos fueron cubiertos con una suspensión de 5×10^4 a 10×10^4 células por ml. y utilizadas a los 5-6 días cuando el monostrato celular estaba completo.

Como sueros controles se usaron, el suero hiperinmune*, y el suero normal obtenido de un cerdo no vacunado, mantenido en aislamiento, el cual fue sangrado un mes después de destetado, para eliminar la posibilidad de la presencia de anticuerpos maternos lo que se comprobó por prueba de seroneutralización e inmunofluorescencia indirecta.

Conjugado contra la Peste porcina.

El conjugado contra la Peste porcina usado para la prueba, fue preparado en el LIMV, por la técnica descrita por The y Feltkamp (107), y es el mismo que se usa para la prueba rutinaria de diagnóstico de la Peste porcina.

Para la realización de la técnica de inmunofluorescencia en la titulación del virus, se hicieron diluciones logarítmicas del virus, usando medio MEM como líquido diluyente; luego 0.2 ml. de cada dilución se sembró en cada uno de cuatro tubos Leighton con monostrato celular PK15, de acuerdo al procedimiento descrito por Mengeling et al. (68). Para ello se consideró como título

* Gentilmente suministrado por el Dr. E. A. Carbrey del National Animal Diseases Laboratory (NADL), Ames, Iowa USA.

infeccioso la dilución más alta que mostraba placas fluorescentes debidas a la infección por el virus.

3.2.7.2. Realización y lectura de la prueba de eficacia.

Seis semanas después de la vacunación se realizó la prueba de efi
cacia de cada una de las tres vacunas ensayadas. Para ello, cada grupo de 10 cerdos pertenecientes a cada vacuna, lo mismo que los cerdos controles, se trasladaron a unidades de aislamiento indepen
dientes. Cada uno de los cerdos vacunados así como los cuatro cer
dos controles, se inocularon por vía subcutánea con 1 ml. de suero sangíneo conteni
endo 10.000 DI₅₀ en cultivo celular de virus viru
lento. Estos cerdos se dejaron en observación durante 15 días des
pués de la inoculación. Durante este período se hizo lectura dia
ria dos veces al día de la temperatura corporal y se observaron las reacciones y síntomas de dichos animales. Las vacunas en esta prueba se consideran eficaces si durante el tiempo de observación, un mínimo de 80% de los cerdos control
es manifiestan síntomas de Peste porcina o muerte y un mínimo de 80% de los cerdos vacunados en cada prueba permanecen sanos, Fechner (42).

3.2.7.3. Recolección de las muestras para la determinación de los títulos de anticuerpos.

En este trabajo se utilizaron un total de 124 muestras para hacer
la determinación de los títulos de anticuerpos. Las muestras fueron sueros recolectados en la forma anteriormente descrita. El total de muestras se discrimina así: 30 corresponden a los

cerdos antes de vacunar, 4 correspondientes a los cerdos controles para comprobar su susceptibilidad a la enfermedad, 60 comprenden las muestras tomadas a los tres grupos a los 10 y 67 días después de la vacunación (este último muestreo corresponde al día anterior a la descarga con virus virulento), y 30 comprenden las muestras tomadas a los cerdos vacunados 15 días después de descargados con virus virulento.

3.2.7.4. Determinación del título de anticuerpos conferidos por las vacunas.

El título de anticuerpos en los sueros así recolectados se determinó por el método de inmunofluorescencia indirecta descrita por Ressang (85), para lo cual fue necesario:

a) Virus indicador.

El inóculo de virus virulento usado como indicador en esta prueba consistió de 0.1 ml. de suero sanguíneo conteniendo 1.000 unidades formantes de placas (UFP). Estas unidades fueron determinadas por titulación del virus en cultivo celular usando la prueba de titulación por inmunofluorescencia descrita por Mengeling et al (68).

b) Cultivo celular.

Se utilizó el mismo cultivo celular ya mencionado en la descripción de la prueba para titulación del virus.

c) Sueros controles.

Suero hiperinmune: se uso el ya descrito para la prueba de titulación del virus, pero éste fue titulado por inmunofluores

cencia indirecta dando un título de 1:64. Aquí como control en esta prueba se uso a la dilución 1:32.

Suero normal: fue el mismo descrito para la titulación del virus.

d) Conjugado anti gama globulina.

El conjugado anti gama globulina se preparó en cabra, según la técnica descrita por Ressang (85), que consiste en la separación de las gama globulinas porcinas. Se hizo a partir de un suero de cerdo normal libre de anticuerpos para Peste porcina. El suero se trato con solución saturada de sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$. Se eliminó el exceso de sulfato de amonio en la suspensión, por dia lisis repetida con solución tamponada fosfatada pH 7.2 durante 24 horas a 2-4°C, cambiando la solución periódicamente. Se pro cedió luego a determinar el contenido proteínico de la suspensión por la técnica de Biuret, Pemberton (77)., en espectofótometro con longitud de onda de 540 mm. Se requirió una concentración de proteina de 10-30 mg/ml. Luego se adicionó solución tamponada de carbonato-bicarbonato de sodio 0.5 M de pH 9.0 a 9.2 en cantidad equivalente al 15% del volumen de la solución de gama globulina. La pureza de esta gama globulina se determinó por inmunoelectroforesis.

Posteriormente se procedió a inmunizar dos cabras adultas, siguiendo la técnica descrita por Ressang (85). Cada animal se inoculó intramuscularmente con 0.6 ml. del siguiente inóculo: 1 mg de gama globulina porcina, 0.1 ml. de adyuvante completo de Freund y 0.5 ml. de solución salina fisiológica estéril. Luego se les

aplicó dos inyecciones adicionales del mismo inoculo por la misma vía a los 21 y 35 días de iniciada la inmunización; 15 días después de la última inoculación las cabras se sangraron. La especificidad del suero anti gama globulina porcina se examinó por inmunoelectroforesis.

Las anti gama globulinas porcinas se separaron del suero, con sulfato de amonio. Una vez obtenida la anti gama globulina pura se hizo la conjugación con el isotiocianato de fluoresceina, según la técnica descrita por The y Feltkamp (107). Se tituló el conjugado para obtener la óptima dilución que produjera fluoresencia con un mínimo de inespecificidad, (virus sin diluir y diferentes diluciones del conjugado). El conjugado se distribuyó en viales en cantidades de 0.25 ml. y se conservó en congelación hasta el momento de su uso. Para el uso el conjugado se diluyó al doble del título.

Procedimiento para la inmunofluorescencia indirecta.

El monostrato celular infectado con el virus de la Peste porcina fue cubierto con suero a la dilución apropiada (1:2 - 1:128). Se usaron tres tubos Leighton con cultivo de células PK15 por cada dilución del suero y se dejaron en incubación a 37^oC en cámara húmeda por 60 minutos. Luego se aplicó el conjugado siguiendo las indicaciones de la técnica descrita por Ressang (85). Los controles fueron tratados de la misma manera que los sueros a examinar. Una ve. montadas las laminillas con glicerina tamponada fueron examinadas al microscopio de fluorescencia usando fill

tro barrera para luz ultravioleta y filtro excitador BG-12. El título del suero fue dado por la dilución mas alta que mostró una fluorescencia débil.

3.2.7.5. Prueba de seroneutralización para determinar el título de anticuerpos conferidos por las vacunas.

A un 33% de las muestras tomadas, se les determinó además el título de anticuerpos por medio de la prueba de seroneutralización por la técnica de anticuerpos fluorescentes, según Carbrej et al. (20).

Para la realización de la técnica se requiere:

a) Cultivo celular.

El cultivo celular usado fue el mismo que se describió para la prueba de titulación del virus.

b) Virus indicador.

Se utilizó un inculo de 0.1 ml. de suero sanguíneo conteniendo 1.000 UFP de virus virulento, el cual fue calculada como se describió para la prueba de inmunofluorescencia indirecta.

c) Sueros controles.

Se usaron los mismos sueros descritos para la inmunofluorescencia indirecta.

d) Conjugado anti Peste porcina.

Se uso el descrito para la prueba de titulación del virus.

Técnica para seroneutralización.

Se siguió la técnica descrita por Carbrej et al. (20).

para ello se tomó una cantidad constante de virus de aproximadamente 1.000 UFP para cada dilución variable de suero, sobre cultivos celulares PK15 mantenidos en tubos Leighton. Se empleó un esquema de diluciones dobles, desde 1:8 hasta 1:128. Para preparar las diluciones se uso el medio MEM como líquido diluyente. La mezcla suero-virus se incubaron luego por 60 minutos en cámara húmeda a 37°C, luego se inocularon 0.2 ml. en cada uno de tres tubos Leighton por dilución. Después de 48 horas de incubación a 37°C en cámara húmeda, se aplicó el conjugado siguiendo la técnica ya descrita por Carbey et al. (20). Los controles en cada prueba fueron: un control positivo usando suero hiperimmune, un control negativo usando suero normal, un control de virus sin suero, este actua igual que el control negativo usando suero normal. Las laminillas una vez montadas con glicerina buferada se observaron al microscopio de fluorescencia.

Los títulos de anticuerpos neutralizantes fueron determinados por la dilución más alta de suero que produjo un 90% de reducción en el número de UFP de virus y como sueros negativos se considera aquellos que causaron menos de un 90% de reducción en el número de UFP de virus a la dilución 1:4.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

El primer paso en este trabajo comprendió la obtención del virus virulento a usarse en la prueba de eficacia de las vacunas. Este virus se obtuvo en suero sanguíneo, de cerdos susceptibles inoculados con el virus virulento, al 5^o día después de la inoculación. Este suero titulado en cultivo celular, por el método de fluorescencia directa y conteo de placas fluorescentes mostró un título de $10^{-3.26}$ DI₅₀.

Los cerdos susceptibles inoculados por vía subcutánea con 1 ml. de sangre desfibrinada conteniendo virus Peste porcina virulento, desarrollaron los síntomas típicos y las lesiones macro y microscópicas de la enfermedad. Los síntomas clínicos aparecieron al segundo día después de la inoculación, los animales mostraron un estado de inapetencia, anorexia y diarrea; entre el 5^o y 6^o día la temperatura corporal se elevó a 41.5°C tiempo en el cual los animales fueron considerados en fase de viremia y por lo tanto sangrados para obtener el virus virulento. En el período final de la enfermedad, los animales mostraron paso tambaleante y en zig zag, coloración púrpura de la piel del abdomen, Figura 1., de la cara interna de las piernas y de las orejas, convulsiones seguida por muerte al día 12 o 14. Estos síntomas clínicos y la muerte confirman que el virus les produjo la enfermedad en forma aguda, según Dunne (35) la enfermedad se considera aguda cuando el animal presenta todos síntomas típicos y muere entre los 10 y 20 días después de la exposición al virus virulento de la Peste porcina.

Las lesiones macroscópicas de Peste porcina observadas a la necrops

sia fueron: hemorragias petequiales del riñon, ganglios linfáticos engrosados y hemorrágicos (principalmente ganglios parotídeos, submaxilares y cervicales), necrosis de las amígdalas, congestión pulmonar, hemorragias y congestión de la vejiga urinaria, hígado tumefacto, congestionado y de color obscuro, infartación del bazo, congestión y hemorragias del cerebro, Figuras 2 y 3.

Entre las lesiones microscópicas de los diferentes órganos se observó: en la tonsila lingual, inflamación fibrinosa; en la adrenal, focos necróticos y hemorrágicos tanto en la zona cortical como en la medular; en el bazo, proliferación de tejido reticular, atrofia de la pulpa blanca; en los ganglios linfáticos, se observó necrosis de los centros germinales y fuerte hemorragia; en el cerebro, se presentó degeneración fibrinosa de los vasos sanguíneos e infiltración perivascular; en la tonsila cecal se observó, necrosis con inflamación de tipo fibrinoso y fuerte hemorragia; los pulmones presentaron edema pulmonar, congestión y hemorragia; en el intestino grueso se presentó, necrosis de coagulación e infiltración fibrinosa de la mucosa; el intestino delgado presentó, hemorragias de la mucosa; el corazón presentó, hemorragias y necrosis de la musculatura; en el estómago se observó hemorragia gástrica; en el cerebelo infiltración perivascular, gliosis y degeneración fibrinoide de los vasos sanguíneos; la válvula ileocecal presentó focos de inflamación de tipo fibrinoso; en el páncreas se observaron infartos producidos por trombos en algunos vasos sanguíneos, además degeneración hidropíca del endotelio de los mismos; la vejiga urinaria presentó gran congestión y ligeros focos hemorrágicos; el hígado se encontró congestionado, el timo hemorrágico con edema y necro

sis de algunos timocitos, además se encontró infiltrado por polimorfo nucleares (inflamación aguda).

La titulación de la dosis infectante de virus en las vacunas, en conejos, fue de $10^{3.5}$, $10^{2.64}$ y 10^3 DI₅₀, para las vacunas Cepa China, Duvaxyn y Cerdo Virac, respectivamente. La máxima temperatura 40.9°C después de la inoculación intravenosa de la vacuna, se presentó a las 120 horas después, la temperatura promedio normal de los conejos fue de 39.4°C.

La prueba de esterilidad de las vacunas por medio de siembras de las vacunas reconstituídas en caldo thioglicolato y placas de agar sangre no mostró, después de las 24 y 48 horas de incubación de los cultivos, presencia de turbidez en el caldo thioglicolato ni presencia de colonias bacteriales en las cajas con agar sangre, a la vez que por coloración de Gram no se observó presencia de bacterias en los frotis hechos a partir de las vacunas o de los medios de cultivo sembrados.

En el período de 10 días, tiempo de observación de la prueba de inocuidad de estos productos, se observó que las vacunas Cepa China, Duvaxyn y Cerdo Virac, aplicadas en dosis de 2 ml. por vía intramuscular en cada uno de los tres grupos de cerdos, no produjeron síntomas clínicos apreciables de la enfermedad a excepción de un ligero aumento de temperatura el cual fue más marcado en los cerdos vacunados con la vacuna Cepa China, alcanzando al 5^o día post-vacunación 0.87 más con respecto a la temperatura promedio normal antes de la vacunación la cual fue 39.67°C, Figura 4. La temperatura promedio máxima observada fue 40.54°C. Los cerdos vacunados con la vacuna Duvaxyn mostraron un aumento de 0.47°C por encima

de la temperatura promedio normal antes de la vacunación que fue de 39.63°C , Figura 4. La temperatura promedio máxima observada fue 40.10°C . Los cerdos vacunados con la vacuna Cerdo Virac mostraron un aumento de 0.43°C en relación con la temperatura promedio normal antes de la vacunación que fue de 39.99°C . Generalmente este aumento de temperatura se observó entre el 4^o y 6^o día después de la vacunación.

Estos resultados indican que un 100% de los cerdos vacunados ya con Cepa China, Duvaxyn o Cerdo Virac, no mostraron reacciones adversas debidas a falta de inocuidad y por lo tanto se puede considerar que estas tres vacunas examinadas cumplen con los requisitos descritos por Dunne (35), Fechner (42) y Mott (72), como indispensables para que puedan ser aceptadas como inocuas.

Los resultados concernientes a la Cepa China confirman los resultados obtenidos por Aynaud y Asso (4) y Torlone et al. (110), Bekaert y Leunen (10), Florent et al. (44), quienes reportaron la absoluta inocuidad de las vacunas a base de Cepa China lapinizada.

En la prueba de eficacia de las tres vacunas examinadas, vacunas Cepa China, Duvaxyn y Cerdo Virac, la descarga hecha a los 67 días después de la vacunación, aplicando 10.000 DI_{50} del virus virulento por vía subcutánea, no produjo durante el período de observación de 14 días, síntomas clínicos de la enfermedad en los cerdos vacunados, la temperatura corporal promedio de cada grupo de cerdos descargado, permaneció dentro de los valores normales, relacionado con la temperatura normal antes de la descarga que fue de 39.22°C , 39.34°C y 39.53°C , respectivamente para

los cerdos vacunados con vacunas Cepa China, Duvaxyn y Cerdo Virac, Figura 5., mientras que en los cerdos controles, la enfermedad se presentó a partir del segundo día después de la inoculación produciendo todos los síntomas clínicos y una marcada elevación de la temperatura corporal la cual alcanzó a 41.5°C al 6° día post-vacunación, Figura 6. La temperatura promedio normal de los cerdos controles antes de la descarga fue de 39.66°C . A partir del 8° día post-inoculación la temperatura fue decreciendo hasta alcanzar valores por debajo de la temperatura normal, observándose temperaturas inferiores a 39.0°C el día anterior a la muerte, Figura 6. La enfermedad continuo progresando rapidamente en forma aguda hasta terminar con la muerte al 14° día. A la necropsia, estos cerdos mostraron todas las lesiones macroscópicas y microscópicas de la enfermedad anteriormente descritas debida al virus Peste porcina virulento.

Estos resultados obtenidos por la prueba de eficacia permiten afirmar que a los 67 días después de la vacunación, los cerdos estaban completamente protegidos contra la enfermedad, por la ausencia de infección después de la descarga hecha con las 10.000 DI_{50} del virus Peste porcina virulento.

En relación con los trabajos anteriores se puede anotar que según Bekaert y Leunen (10), se ha encontrado completa protección a la enfermedad en cerdos vacunados con la vacuna Cepa China lapinizada, cuatro meses después cuando fueron descargados con 10.000 DI_{50} de virus Peste porcina virulento por vía intramuscular.

Parra (76), en su trabajo sobre potencia de la vacuna Cepa China



FIGURA 1. Lesiones cutáneas en un cerdo afectado de Peste porcina.



FIGURA 2. Lesiones macroscópicas de Peste porcina en riñón, cerebro y páncreas.



FIGURA 3. Lesiones macroscópicas de Peste porcina en ganglios linfáticos, cerebro e hígado.

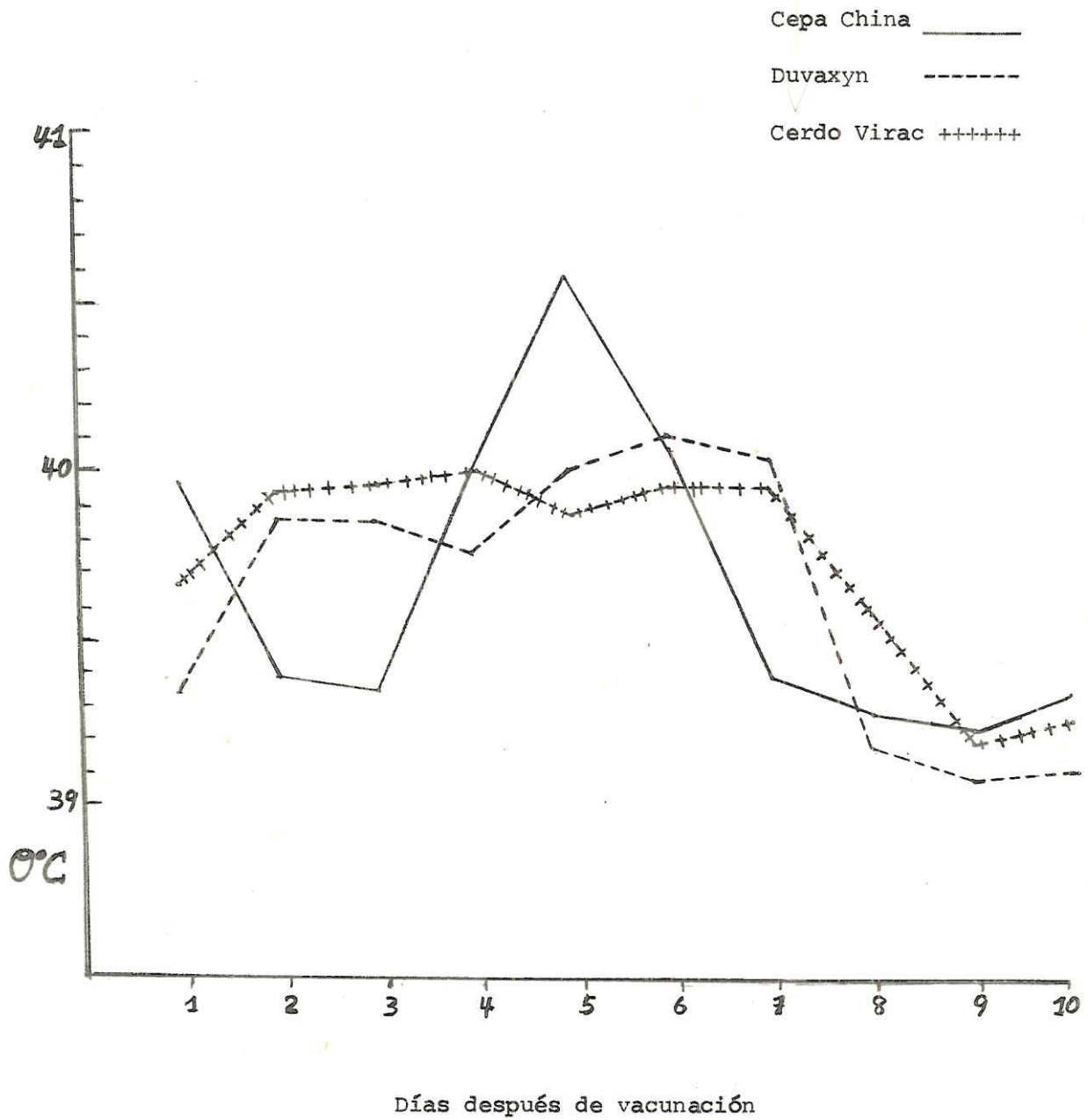


FIGURA 4. Temperatura promedio de los cerdos vacunados con las vacunas Cepa China, Duvaxyn y Cerdo Virac.

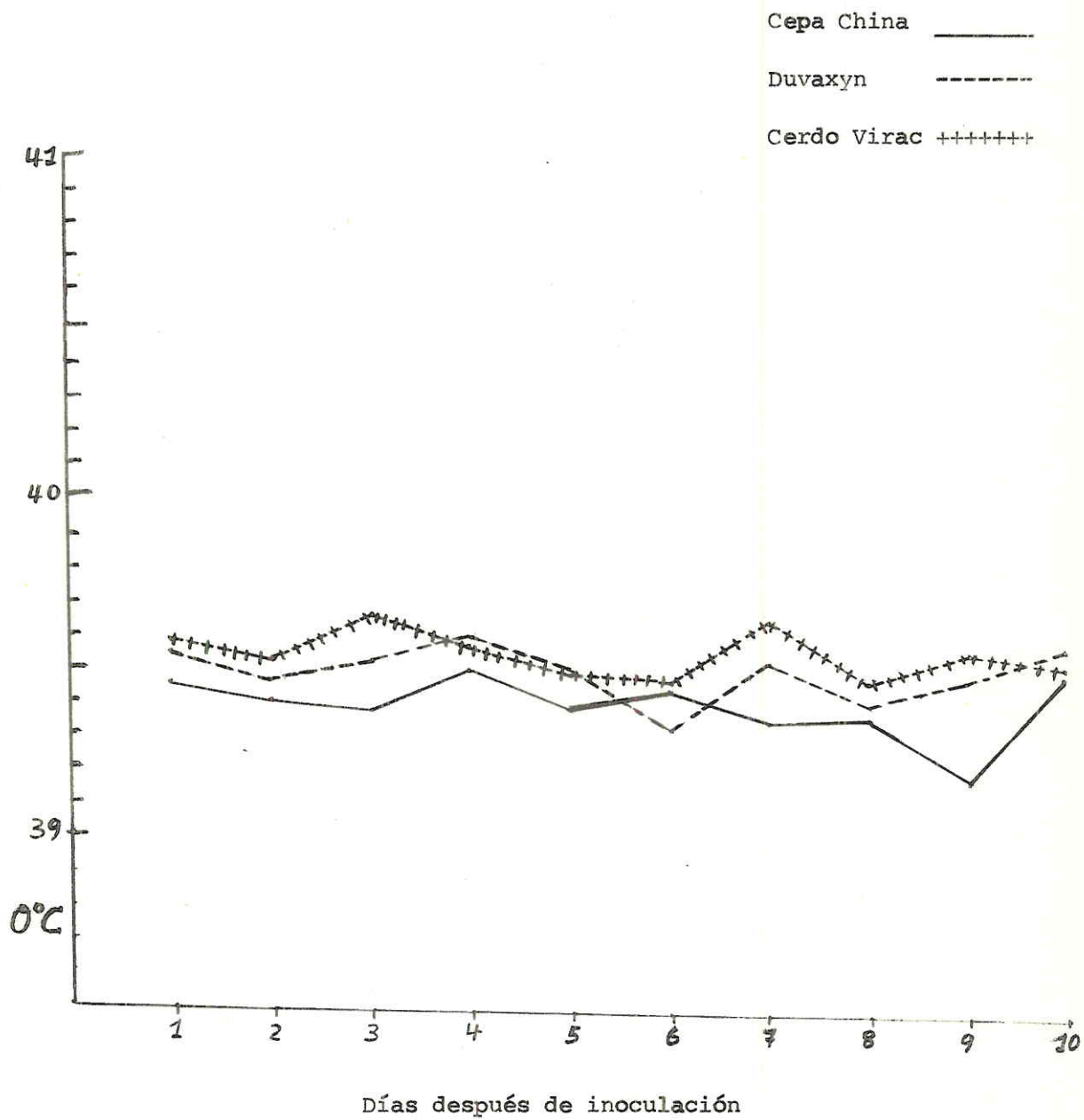


FIGURA 5. Temperatura promedio observada en los cerdos vacunados durante 10 días después de inoculados con 10.000 DI_{50} de virus virulento.

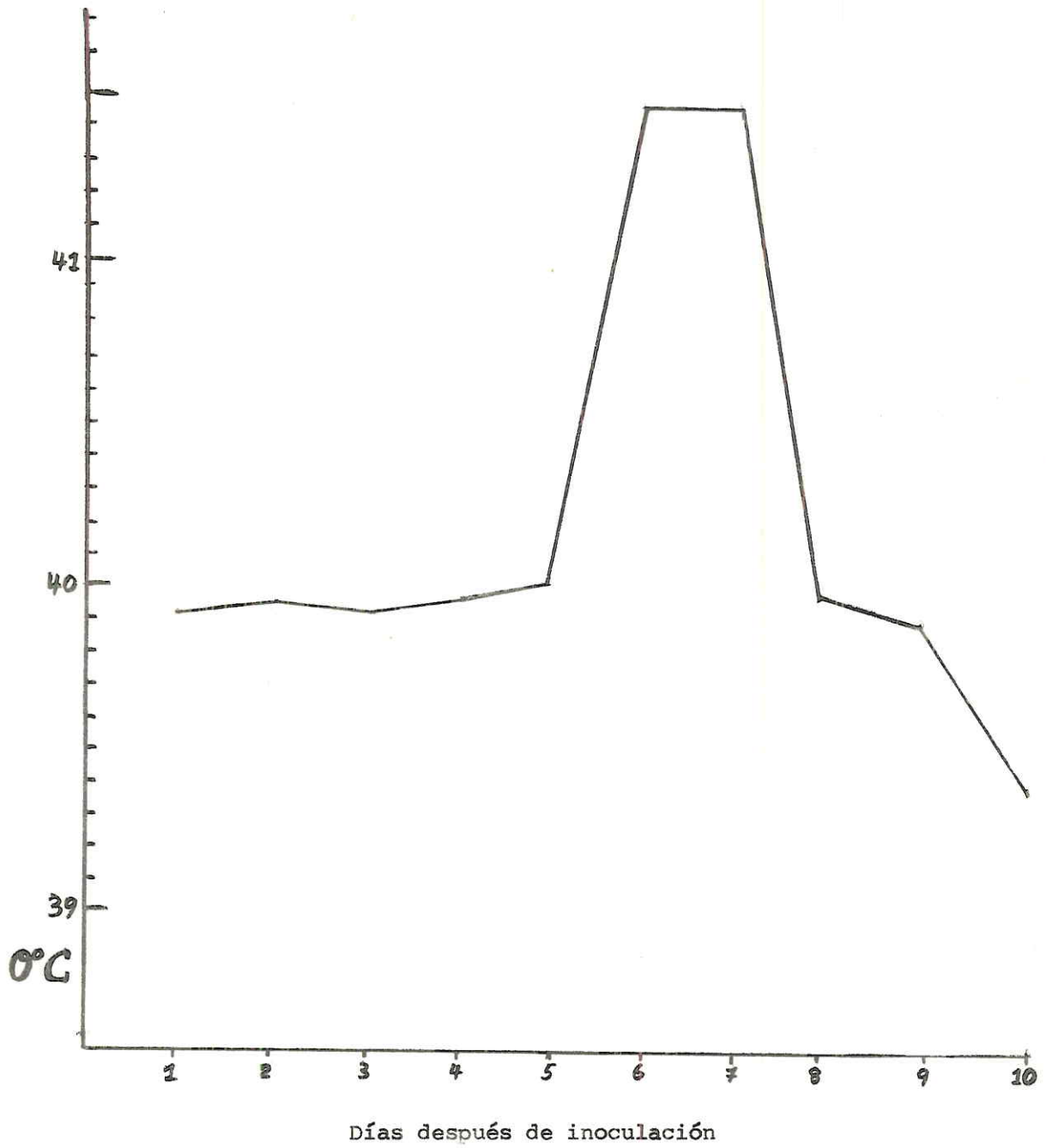


FIGURA 6. Temperatura promedio en los cerdos controles después de inoculados con 10.000 DI_{50} de virus virulento de la Peste porcina.

lapinizada llevada a cabo descargando 10^6 DI_{50} de virus Peste porcina vi por vía subcutánea, reportó que un 80% de los cerdos vacunados mostraron resistencia a la infección inoculados 30 días después de la vacunación.

Según Torlone et al. (110), se ha encontrado resistencia a 10^6 DI_{50} de virus Peste porcina virulento descargado por vía parenteral, al 7^o día después de la vacunación con vacuna Cepa China lapinizada y persistencia de tal resistencia hasta 16 meses después, tiempo en el cual se hizo el último control. Igual resistencia ha sido reportada por Bass y Ray (8), Schmidt (93), a partir del 3^o y 4^o día después de la vacunación, usando vacunas a virus vivo modificado en conejo y vacunas vivas modificadas preparadas con Cepa A del virus de la Peste porcina.

De acuerdo con los resultados obtenidos por la descarga, se considera que un 100% de los cerdos vacunados con cada una de estas tres vacunas, Cepa China, Duvaxyn y Cerdo Virac, permanecieron sanos, mientras que un 100% de los cerdos controles mostraron síntomas típicos de la Peste porcina y murieron. Estos datos confirman que estas vacunas cumplen con los requisitos descritos por Dunne (35), Fechner (42) y Mott (72), acerca de las condiciones que debe llenar una vacuna para ser considerada como eficaz.

Debido a que las 10.000 DI_{50} del virus virulento mostraron tener un alto poder infectante para los cerdos controles susceptibles, puede decirse de acuerdo con Mengeling (65) y Mengeling et al. (68), que la prueba de titulación in vitro del virus no citopatógeno de la Peste porcina, por el método de placas fluorescentes, es de gran confiabilidad.

De acuerdo con Mengeling y Torrey (67) y Carbrey et al. (18), esta prueba también puede ser usada para medir exactamente el título infectante del virus.

Mediante la detección de anticuerpos usando las pruebas de inmunofluorescencia indirecta y seroneutralización por anticuerpos fluorescentes, se pudo comprobar que antes de la vacunación con estos tres tipos de vacunas, todos los cerdos fueron negativos a anticuerpos contra la Peste porcina a la dilución 1:4, Figura 7., lo mismo que los cuatro cerdos controles. Por pruebas de inmunofluorescencia indirecta se observó que a los 10 días después de la vacunación los cerdos mostraron títulos de anticuerpos de 1:32 y 1:64; un 90% de los cerdos en cada uno de los tres grupos vacunados ya con vacuna Cepa China, Duvaxyn o Cerdo Virac, mostró títulos de anticuerpos de 1:64 Figura 8., mientras que el 10% restante de cerdos mostró un título de anticuerpos de 1:32. A los 15 días después de la descarga se encontró el mismo título de anticuerpos. Por pruebas de seroneutralización por anticuerpos fluorescentes se observó a los 10 días después de la vacunación, un título de anticuerpos de 1:32 en los cerdos vacunados con Cepa China y Duvaxyn y un título de anticuerpos de 1:64 en los cerdos vacunados con Cerdo Virac; por esta misma prueba se observó a los 67 días después de la vacunación un título de anticuerpos de 1:32 para los cerdos vacunados con vacuna Cepa China y un título de anticuerpos de 1:64 en los vacunados con Duvaxyn y Cerdo Virac; a los 15 días después de la descarga se observó un título de anticuerpos igual al encontrado a los 67 días después de la vacunación.

Carbrey et al. (20) encontraron por pruebas de seroneutralización

títulos de anticuerpos de 1:16 a 1:256, a los 35 y 95 días después de la vacunación con vacunas a virus vivo modificado en cultivo celular; cuando estos cerdos se descargaron a los 120 días post-vacunación mostraron títulos de anticuerpos de 1:256 y más.

Torlone et al. (110) encontraron por pruebas de seroneutralización títulos de anticuerpos de 1:32 en todos los cerdos a los 15 días después de vacunados con vacuna Cepa China lapinizada.

En lo referente al grado de inmunidad conferido por las vacunas se puede decir que a los 67 días post-vacunación, tiempo en que se hizo la descarga, todos los animales estaban realmente inmunizados y que el título de anticuerpos observados por las pruebas de inmunofluorescencia indirecta y seroneutralización por anticuerpos fluorescentes, confirma la resistencia a la descarga experimental, por la presencia de una rata significativa de anticuerpos en los animales después de vacunados. El título de anticuerpos fue de 1:64 a los 67 días después de la vacunación. Se encontró una ligera disminución en el título de anticuerpos determinados por la prueba de seroneutralización por anticuerpos fluorescentes; esto probablemente es debido a que ésta prueba es más específica que la prueba de inmunofluorescencia indirecta.

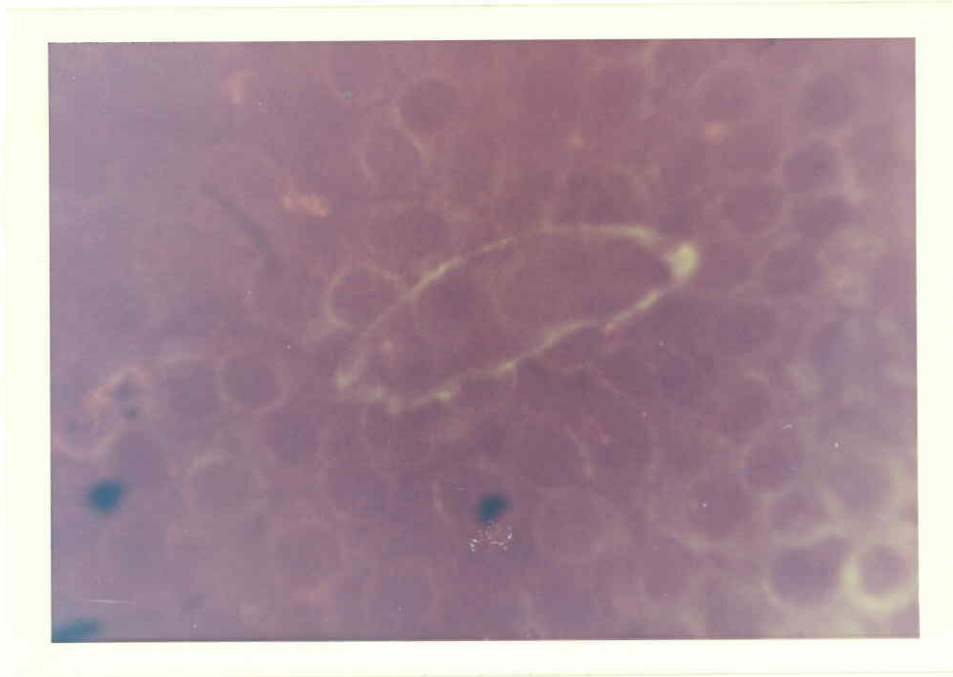


FIGURA 7. Suero negativo a prueba de seroneutralización.

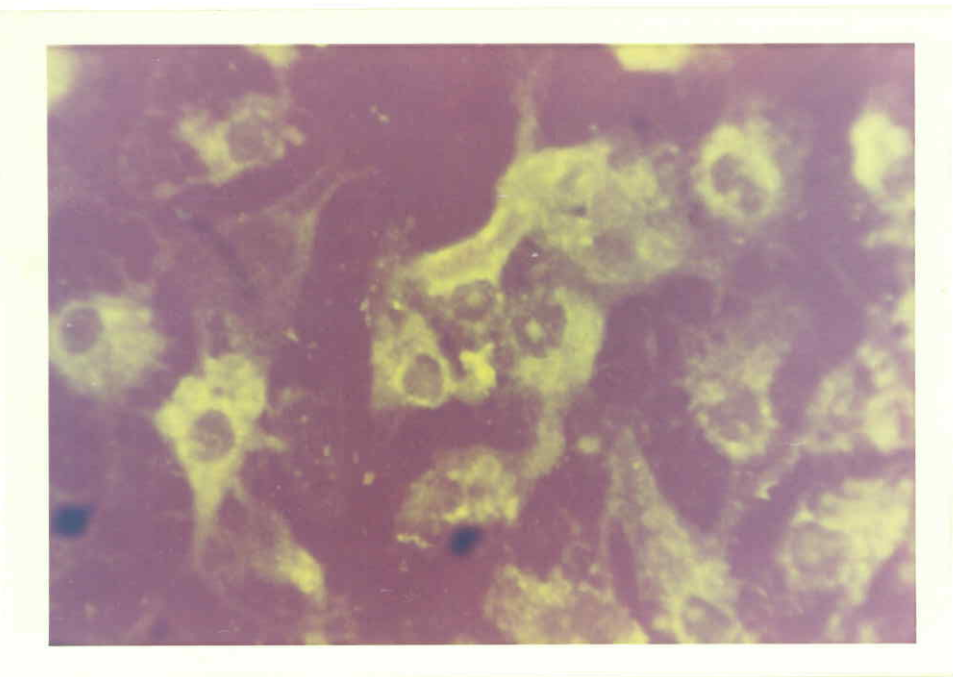


FIGURA 8. Suero positivo a la prueba de inmunofluorescencia indi
recta.

5. CONCLUSION Y RECOMENDACIONES

El número de dosis infectantes del virus contenidas en los 2 ml. de vacuna aplicados como dosis rutinaria, se pueden considerar suficientes para inducir una adecuada respuesta inmune, como se comprobó por la capacidad de resistencia de los animales a la infección experimental con virus virulento.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, las vacunas examinadas, Cepa China, Duvaxyn y Cerdo Virac, preparadas a base de virus vivo modificado en conejos, contra la Peste porcina, se pueden considerar como totalmente inocuas debido a que en un 100% de los cerdos vacunados no originaron síntomas apreciables de la enfermedad, a excepción de un ligero aumento de temperatura entre el 4^o y 5^o día después de la vacunación, el cual alcanzó su valor normal en unos dos días.

Las vacunas examinadas se pueden considerar como eficaces, debido al 100% de resistencia a la infección observado en los cerdos vacunados, a la descarga hecha con 10.000 DI₅₀ de virus Peste porcina virulento.

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten que las vacunas aquí ensayadas puedan ser consideradas como aptas para el uso en campañas de control de la Peste porcina ya que cumplen con los requisitos de una vacuna ideal, tales como producir un 90% o más de respuesta inmune en los cerdos vacunados, los cerdos quedan refractarios a la enfermedad, y no producen evidencia clínica de la enfermedad después de la aplicación.

Se puede pensar por la experiencia efectuada en el laboratorio, la utilidad de la aplicación rutinaria en el campo, de las vacunas Cepa China, Duvaxyn y Cerdo Virac, contra la Peste porcina; para ello es necesario que estas vacunas sean aplicadas en animales mantenidos en buenas condiciones de manejo y alimentación, libres de enfermedades parasitarias y bacteriales y que las vacunas sean aplicadas siguiendo las indicaciones de la casa productora, con buen mantenimiento y manejo de las vacunas y en lo posible por un veterinario.

Las pruebas de inmunofluorescencia indirecta y seroneutralización por anticuerpos fluorescentes, constituyen un medio seguro y eficaz para poner de manifiesto los títulos de anticuerpos, lo que prueba de nuevo su gran eficacia en el reconocimiento de casos crónicos de la enfermedad o presencia de resistencia a la enfermedad ya por exposición natural con el virus virulento de campo, o por la vacunación. Además el conteo de placas fluorescentes mostró ser segura y constituir la técnica adecuada para medir con precisión el título infectante del virus no citopático de la Peste porcina.

Es necesario continuar con estudios mas a fondos acerca de las vacunas a virus vivo modificado, en lo que se refiere a posible reversión de virulencia del virus vacunal, efecto del virus vacunal sobre cerdos con tactos susceptibles y creación o no de un estado de portador en el animal vacunado, ya que conociendo estos factores podriamos llegar a tener un conocimiento más profundo de las posibles causas de brotes esporádicos que comunmente se presentan en el país y con ello llegar a obtener un mejor control de la enfermedad.

Para llegar a adquirir cambios ventajosos en el control de la enfermedad es necesario hacer divulgación sobre la importancia de la vacunación en la protección contra la Peste porcina, por medio del empleo de estas vacunas a virus vivo modificado, que además de inocuas y eficaces establecen un real grado de inmunidad contra infecciones severas del virus y sobre la necesidad de reportar inmediatamente al servicio veterinario mas cercano los casos sospechosos de la enfermedad a fin de proceder a confirmar éstos por medio de los exámenes de laboratorio, ya que se cuenta con técnicas de diagnóstico rápidas y seguras. Sobre recalcar la necesidad de levantar las crías de cerdos bajo las mejores condiciones, con estricto cumplimiento de las medidas sanitarias y de prevención para lo cual es ventajoso recurrir a los servicios oportunos de un veterinario.

6. RESUMEN

Este trabajo se llevó a cabo con el fin de hacer una evaluación del grado de inocuidad y eficacia de tres vacunas a virus vivo modificado contra la Peste porcina, vacunas Cepa China, Duvaxyn y Cerdo Virac, las cuales están siendo vendidas comercialmente y usadas en el control de la enfermedad en el país. Además se determinaron los títulos de anticuerpos conferidos por las tres vacunas antes mencionadas, por pruebas de inmunofluorescencia indirecta y seroneutralización por anticuerpos fluorescentes.

Se hizo control de esterilidad de las vacunas, observándose ausencia de gérmenes bacteriales asociados; para la realización de las pruebas de inocuidad y eficacia de las vacunas se utilizó un grupo de 10 cerdos para cada una de las vacunas, los cuales mostraron ser negativos a anticuerpos contra la Peste porcina antes de la vacunación. Por los resultados obtenidos en la prueba de inocuidad y eficacia, estas vacunas se pueden considerar como inocuas y además se pueden considerar como eficaces, debido a que los cerdos no mostraron síntomas clínicos apreciables de la enfermedad después de vacunados, y debido al 100% de resistencia a la infección observado en los cerdos vacunados al ser descargados con 10.000 DI_{50} de virus virulento de la Peste porcina. Este título se determinó usando la prueba de anticuerpos fluorescentes en cultivo celular PK15. El 100% de los cerdos controles susceptibles murieron al ser tratados con virus virulento. Para observar el poder infectante del virus vacunal, se hizo titulación de las vacunas en conejos, encontrándose títulos de $10^{3.5}$, $10^{2.64}$ y 10^3 , para las vacunas Cepa China, Duvaxyn y Cerdo Virac respectivamente.

Por pruebas de inmunofluorescencia indirecta y seroneutralización por anticuerpos fluorescentes, se encontraron títulos de anticuerpos de 1:32 y 1:64, a los 10 días después de la vacunación con estas tres vacunas. No se observó aumento en el título de anticuerpos en estos cerdos a los 15 días después de descargados con el virus virulento.

Con esta investigación se pudo comprobar que los títulos de anticuerpos observados en los cerdos vacunados, son suficientes para prevenir una infección con dosis altas de virus virulento de la Peste porcina.

7. SUMMARY

The purpose of this work was to evaluate the efficacy, sterility and innocuity of three modified virus vaccines against Hog Cholera: China strain, Duvaxyn, and Cerdo Virac. These vaccines are commercially available and have been used for controlling the disease in this Country. It also were determined the titers of antibodies produced by these vaccines using the indirect fluorescent antibody technique and neutralization technique.

No contaminant bacterial, virus or fungus were detected in either one of the tree vaccines.

Ten pigs were used in testing the innocuity and efficacy of each vaccine. There were not symptoms of disease in either group after vaccination. Complete resistance to challenge to 10.000 DI₅₀ in pigs of all

three groups was observed. Non-vaccinated controls under the same challenge-dose, showed typical symptoms and subsequent death.

The infecting capacity of the vaccines, as determined in rabbits was, for China Strain $10^{3.5}$, Duvaxyn $10^{2.64}$ and Cerdo Virac $10^{3.0}$.

The antibodies detected 10 days after vaccination by the indirect immunofluorescent test and neutralization test by fluorescent antibody technique had titers of 1:32 and 1:64. There was not increase in the level of antibodies 15 days after the challenge. I can conclude that the titers of antibodies conferred by the vaccines are enough to prevent infections with high doses of virulent virus.

BIBLIOGRAFIA

1. AIKEN, F. M. et al. 1964. Rapid Diagnosis of Hog Cholera: A Tissue -
impression Fluorescent-Antibody Technique. Jour. Amer. Vet. Med.
Assoc. 144:395-397.
2. _____, et al. 1967. Nonspecificity of Fluorescent-Antibody test
for distinguishing Hog Cholera virus strains. Jour. Amer. Vet.
Med. Assoc. 150:59-61.
3. ATKINSON, G. F. et al. 1962. Bovine Virus Diarrhea (BVD) Vaccine
for protection of pigs against Hog Cholera. Proc. U. S.
Livestock. San. Ann. 66:59-61.
4. AYNAUD, J. M. et J. ASSO. 1970. La souche lapinisee, dite Chinoise,
du virus de la Peste porcine classique; Proprietes. Rec. Med. Vet.
(Francia) 146:119-139.
5. _____, et al. 1973. Estudio de las propiedades de Mutantes Frias
del virus de la Peste porcina clasica, su aplicaci3n en la vacu
naci3n. Gaceta Veterinaria. (Argentina) 25:393-397.
6. BAKER, J. A. 1946. Serial passage of Hog Cholera virus in rabbits.
Proc. Exper. Biol. Med. (EE.UU.) 63:183-187.
7. _____; L. COGGINS and D. ROBSON. 1964. Study of Hog Cholera
colostral Antibody and its effect on Active Hog Cholera Immunization.
Jour. Amer. Vet. Res. 25:618-626.

8. BASS, E. P. and J. D. RAY. 1963. Evaluation of a tissue culture Hog Cholera Vaccine. Jour. Amer. Vet. Med. Assoc. 142:1112-1117.
9. BEALS, T. et al. 1970. A report of the involvement of markets in the spread of Hog Cholera. Proc. U. S. Livestock. San. Ann. 74:416-420.
10. BEKAERT, J. H. et J. LEUNEN. 1969. Le Vaccin Attenué contre la Peste porcine "Souche Chinoise". Bull. Off. int. Epiz. (Francia) 72: 705-715.
11. BETHKE, R. M. et al. 1951. The Hog Cholera problem in the United States. Jour. Amer. Vet. Med. Assoc. 118:227-228.
12. BOYNTON, W. H. 1946. Preliminary report on the propagation of Hog Cholera virus in vitro. Vet. Med. (EE.UU.) 41:346-347.
13. _____, et al. 1948. Further studies on propagation of Hog Cholera virus in vitro including electromicrographs. Vet. Med. (EE.UU.) 43:403-406.
14. BRAN, L. et al. 1964. Studies on an apathogenic strain of lapinized Swine Fever virus. Vet. Bull. (Inglaterra) 35:97-102.
15. BRUECKNER, A. H.; J. W. MUNCE and W. S. GOCHENOUR. 1952. Active immunization with Swivax in pigs previously treated with Anti-Hog Cholera serum. Allied. Vet. (EE.UU.) 23:17-21.
16. CANNON, P. R. 1950. The role proteins in rabbits to resistance to infection. Jour. Amer. Vet. Med. Assoc. 116:451-453.

17. CARBREY, E. A. 1965. The role of Immune Tolerance in transmission of Hog Cholera. Jour. Amer. Vet. Med. Assoc. 146:233-237.
18. _____, et al. 1965. Technical aspects of tissue culture Fluorescent Antibody Technique. Proc. U. S. Livestock. San. Ann. 69:487-500.
19. _____, et al. 1966. Transmission of Hog Cholera by pregnant Sows. Jour. Amer. Vet. Med. Assoc. 149:23-30.
20. _____, et al. 1969. Confirmation of Hog Cholera diagnosis by rapid Serum-Neutralization Technique. Jour. Amer. Vet. Med. Assoc. 155:2201-2209.
21. CARMICHAEL, L. E.; D. S. ROBSON and F. D. BARNER. 1962. Transfer and decline of maternal infections Canine Hepatitis antibody in puppies. Proc. Exper. Biol. Med. (EE.UU.) 109:408-412.
22. COGGINS, L. 1964. Study of Hog Cholera calostrical Antibody and its effect on Active Hog Cholera immunization. Amer. Jour. Vet. Res. 25:613-617.
23. _____, and J. A. BAKER. 1964. Standardization of Hog Cholera Neutralization test. Amer. Jour. Vet. Res. 25:408-412.
24. _____, and B. E. SHEFFY. 1961. A Serological (Neutralization) test for Hog Cholera. Proc. U. S. Livestock. San. Ann. 65:333-337.
25. _____; B. E. SHEFFY and J. BAKER. 1962. Response of Swine to Hog Cholera Vaccines. Proc. U. S. Livestock. San. Ann. 66:316-321.

26. _____, and W. P. HEUSCHEL. 1966. Use of Agar Diffusion Precipitation test in the diagnosis of African Swine Fever. Amer. Jour. Vet. Res. 27:485-488.
27. CRAWFORD, J.G. and T. R. DAYHUFF. 1968. Hog Cholera; preparation of a Hog Cholera Immunogen from Photodynamical Inactivated Virus. Amer. Jour. Vet. Res. 29:741-747.
28. DALE, C. N. et al. 1951. Variations (Variants) of Hog Cholera virus. Amer. Jour. Vet. Med. Assoc. 118:279-283.
29. _____, and J. R. SONGER. 1966. Evaluation of Cristal Violet Glycerol Hog Cholera Vaccine: Comments on a proposed reproducible test. Amer. Jour. Vet. Res. 27:1657-1662.
30. DARBYSHIRE, J. H. 1960. A Serological relationship between Swine fever and Mucosal Disease of cattle. Vet. Rec. (Inglaterra) 72: 331-335.
31. _____. 1962. Agar Gel Diffusion with a Mucosal Disease of cattle. I. Preliminary results with the Technique. Res. Vet. Sci. (Inglaterra) 3:118-125.
32. DUNNE, H. W. 1961. The pattern and causes of "Breaks" following vaccination Attenuated Hog Cholera Vaccines. Jour. Amer. Vet. Med. Assoc. 138:311-315.
33. _____. 1962. Attenuated Vaccines for initial phase of Hog Cholera Erradication. Jour. Amer. Vet. Med. Assoc. 141:373-379.

34. DUNNE, H. W. 1967. Cólera del Cerdo. En Enfermedades del Cerdo. Traducido de la 2ed. inglesa por J. Perez y A. Beltrán. México, UTHEA. pp153-198.
35. _____. 1970. Vaccines and Vaccination; Hog Cholera (European Swine Fever) with excerpts from Diseases of Swine. Iowa, University Press. pp24-34. (Mimeografiado)
36. _____, and M. ALIBASOGLU. 1961. Attempts to vaccinate pigs following treatment with Anti-Hog Cholera Serum. Jour. Amer. Vet. Med. 138:145-148.
37. _____, and C. D. CLARK. 1968. Embryonic death, fetal mummification stillbirth, and neonatal death in pigs of gilts vaccinated with Attenuated Live-Virus Hog Cholera Vaccine. Amer. Jour. Vet. Res. 29:787-796.
38. _____, et al. A study of an Encephalic strain of Hog Cholera Virus. Amer. Jour. Vet. Res. 13:277-280.
39. _____, et al. 1957. The in vitro growth of Hog Cholera virus in cells of peripheral blood. Amer. Jour. Vet. Res. 18:502-509.
40. EDWIN, I. P. 1969. Experimental Inactivated Virus Hog Cholera Vaccines induction period of immunity. Amer. Jour. Vet. Res. 28:915-919.
41. EMERSON, J. L. and A. L. DELEZ. 1965. Cerebelar hypoplasia, hypomyelinogenesis and congenital tremors of pigs, associated with prenatal Hog Cholera vaccination of Sows. Jour. Amer. Vet. Med. Assoc. 147:47-59.

42. FECHNER, J. 1966. Vacunación contra la Peste porcina. En Vacuna y Vacunación de los animales Domésticos. Traducido de la led. por C. Sanchez y G. Montes. Zaragoza, Acribia. pp136-151.
43. FELDMAN, H. A. and S. W. STEPHEN. 1961. Sensitivity of various viruses to Chloroform. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. (EE.UU.) 106:736-739.
44. FLORENT, A.; J. THOMAS et J. LEUNEN. 1969. Controle des Vaccins Vivants contre la Peste porcine interet de l'immunodepression pour la mise en evidence de la Virulence Residual. Bull. Off. int. Epiz. (Francia) 72:665-669.
45. GILLESPIE, J. H. and L. COGGINS. 1966. Hog Cholera and Bovine Virus Diarrhea. In Basic Medical Virology. Baltimore, Williansky Wilkins. pp585-589.
46. GORET, P. 1973. Vaccination contre la Peste porcine classique a l'aide de "Souches Chinoise". Rec. Med. Vet. (Francia)114 : 721-732.
47. _____; P. PRECAUSTA et F. PERRENOT. 1971. Etude d'un virus vaccin modifie contre la Peste porcine classique a partir de une souche "Chinoise" (CL) adaptee a la culture de cellules renales d'agneau. Emploi dans les conditions de la pratique. Bull. Acad. Vet. (Francia) 44:257-262.
48. HARVEY, M. J. and F. COOPER. 1954. Effect of exposure to Hog Cholera

- virus before and after vaccination with Modified Live Virus Vaccine.
Jour. Amer. Vet. Med. Assoc. 124:141-142.
49. HELL, H. 1937. Early research and present day problems in Hog Cholera
immunization. Jour. Amer. Vet. Med. Assoc. 91:544-549.
50. HUCK, R. A. and F. W. ASTON. 1964. The "Carrier sow" in Swine Fever.
Vet. Rec. (Inglaterra) 76:1151-1154.
51. HUDSON, J. R. 1953. Peste porcine; l'adaptation du Virus au lapin
et l'utilisation du Virus adapte pour immunizer les porcs. Bull.
Off. int. Epiz. (Francia) 40:60-73.
52. HUGHES, R. W. and D. P. GUSTAFSON. 1966. Some factors that influence
Hog Cholera Transmission. Amer. Jour. Vet. Res. 21:464-471.
53. KENNETH, D. W. and N. B. KING. 1962. Additional studies of passive
immunity against in young pigs. Jour. Amer. Vet. Med. Assoc. 140:
470-475.
54. _____, and V. L. SANGER. 1962. Inoculation of baby pigs with
lapinized Hog Cholera Vaccine. (2 ml.). Jour. Amer. Vet. Med.
Assoc. 141:470-475.
55. _____; V. L. SANGER and A. LAGACE. 1962. Inoculation of baby pigs
with lapinized Hog Cholera Vaccine (1 ml.). Jour. Amer. Vet. Med.
Assoc. 141:464-469.
56. KERNKAMP, H. V. 1960. Virus in Hog Cholera. Jour. Amer. Vet. Med.
136:149-153.

57. KORN, G. K.; K. SCHJERNING et H. LIEBEKE. 1969. La mise en evidence d'antigenes et d'anticorps (Immuno-fluorescence, reaction de Fixation du complement, test de Neutralization de serum et test au gel d'agar) dans foyer de Peste porcine classique ayant debute par la mort de porcelets. Bull. Off. int. Epiz. (Francia) 72: 531-542.
58. KUMAGAI, T. et al. 1958. Detection of Hog Cholera virus by effect on Newcastle virus in Swine tissue culture. Science. (EE.UU.) 128:366-370.
59. _____, et al. 1961. A New method (END) for detection and measurement of Hog Cholera virus and tis Antibody by means of effect of HC virus on Newcastle disease virus in Swine tissue culture. I. Establihment of standar procedure. Jour. Immunol. (EE.UU.) 87:245-256.
60. LOAN, R. W. and D. P. GUSTAFSON. 1961. Cultivation of Hog Cholera virus in Subculturable Swine Buffy Coat Cells. Amer. Jour. Vet. Res. 22:741-745.
61. MANSI, W. 1957. The study of some viruses by the Plate Gel Diffusion Test. Jour. Comp. Path. (Inglaterra) 67:297-302.
62. MATUMOTO, M. et al. 1961. A New method IN Vitro (END) for Hog Cholera virus and its Antibody by means of effect of Hog Cholera virus on Newcastle disease virus in Swine tissue culture. II. Some Charac_{teristics} of END methods. Jour. Immunology. (EE.UU.) 87:256-268.

63. MCKISSICK, G. E. and D. P. GUSTAFSON. 1967. In vivo demonstration of lability of Hog Cholera virus to Lyophilic Agents. Amer. Jour. Vet. Res. 28:902-912.
64. MELNICK, J. L. 1972. Classification and Nomenclature of Viruses, 1972. Prog. Med. Virol. (EE.UU.) 14:321-332.
65. MENGELING, W. L. 1968. A Fluorescent Microplaque assay for Hog Cholera Virus. Arch ges Virus Forsch. 23:27-39.
66. _____, and L. DRAKE. 1969. Replication of Hog Cholera virus in cell culture. Amer. Jour. Vet. Res. 30:1817-1823.
67. _____, and P. TORREY. 1967. Evaluation of the Fluorescent Antibody Cell culture test for Hog Cholera diagnosis. Amer. Jour. Vet. Res. 128:1653-1659.
68. _____; E. C. FIRTLE and J. P. TORREY. 1963. Identification of Hog Cholera viral Antigen by Immunofluorescence. Application as a diagnosis and assay method. Cand. Jour. Comp. Vet. Sci. 27:249-252.
69. MERCHANT, I. A. and R. A. PAKER. 1967. The generalized infection group. Veterinary Bacteriology and Virology. 6ed. Ames, State University Press. pp824-829.
70. MOLNAR, I. L. 1954. Precipitations experiments with Swine Fever virus containing material. Acta. Vet. Hung. 4: 247-251.
71. MULHERN, J. M. 1960. Is Hog Cholera Erradication possible? Jour. Amer. Vet. Med. Assoc. 136:282-287.

72. MOTT, L. V. 1961. Hog-Cholera Virulent Virus and Killed Virus Vaccine. Properties and Immunological aspects. Proc. Symposium on Hog Cholera. College Veterinary Medicine. University of Minnesota. (EE.UU.) pp135-170.
73. NELSON, J. B. 1932. The maternal transmission of vaccinal immunity in Swine. Jour. Exper. Med. (EE.UU.) 56:835-840.
74. NEWBERNE, J. W. et al. 1959. Recent studies on the properties of a nonvirulent living Hog Cholera Vaccine. Vet. Med. (EE.UU.) 54:41-47.
75. OSE, E. E. et al. Characterization of a new tissue culture Hog Cholera Vaccine. Vet. Med. (EE.UU.) 59:606-609.
76. PARRA, L. G. 1973. Vacuna lapinizada contra la Peste porcina clasica "Cepa China" Congreso Panamericano de Medicina Veterinaria y Zootenia. 7, Bogotá, 1973. pp1-40.
77. PEMBERTON, J. R. 1967. Biuret test. 2^o Veterinary Biologics Division Symposium on Fluorescent antibody. National Animal Disease Laboratory. Ames, Iowa. p15.
78. PHILLIPS, L. E. 1966. Safety testing Hog-Cholera virus Modified Vaccine. Proc. U. S. Livestock. San. Ann. 76:302-309.
79. PILCHARD, E. I. 1966. Hog-Cholera lesions in Swine given Modified Vaccine. Jour. Amer. Vet. Med. Assoc. 148:48-51.
80. PIRTLE, E. C. 1964. A Soluble antigen from Hog-Cholera virus

- propagated in tissue culture. I. Preparation and Characterization of antigen. *Canad. Jour. Comp. Med. Sci.* 28:193-196.
81. _____, and D. E. GUTEKUNST. 1964. Relationship between the soluble antigens of Hog-Cholera and Bovine Viral Diarrhea. Viruses prepared in tissue culture. *Vet. Rec. (Inglaterra)* 76:1177-1178.
82. _____, and W. H. MENGELING. 1971. Antigenic differences in two Hog Cholera virus strains. *Amer. Jour. Vet. Res.* 32:1473-1477.
83. PRECAUSTA, P.; F. PERRENOT et J. TERRE. 1973. Peste porcine classique; etude de la Serovacunacion a l'aide de la souche Chinoise CL. *Rec. Med. Vet. (Francia)* 149:629-635.
84. REED, L. J. and F. MUENCH. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Jour Hyg. (EE.UU.)* 27:493-495.
85. RESSANG, A. A. et DEN BOER. 1971. Peste porcine classique. Immunofluorescence indirecta pour la mise en evidence des anticorps "Anti Peste porcine". Properties du virus de la Peste porcine classique et Diagnosis Differentiel des Pestes porcine classique et Africaine. Amsterdam. pp.41-82.
86. ROBSON, D. S. et al. 1961. The serum Neutralization test as a indicator of immunity against Hog-Cholera. *Proc. U. S. Livestock. San. Ann.* 65:338-342.
87. _____, et al. 1961. Standartization of quantitative serological test. *Proc. U. S. Livestock. San. Ann.* 65:74-78.

88. RODABAUGH, D. E.; H. B. WRIGHT and E. CECIL. 1960. Factors influencing immunity in Hog Cholera vaccination. Jour. Amer. Vet. Med. Assoc. 136:617-621.
89. SAMPSON, G. R. et al. 1965. Inoculation of Swine with CJ strain tissue culture Hog Cholera Vaccine. Jour. Amer. Vet. Med. Assoc. 146:836-839.
90. SANDERS, F. F. et al. 1961. Serum interference with Modified Live Hog Cholera Vaccine. Vet. Med. (EE.UU.) 56:261-266.
91. SCHARTE, L. H. 1957. Experimental investigations on current strains of Hog Cholera Virus. Jour. Amer. Vet. Med. Assoc. 131:93-96.
92. SCHATZ, W. L. et al. 1967. The recovery of Hog Cholera virus from Swine with an in Utero infection. Jour. Amer. Vet. Med. Assoc. 150:192-195.
93. SCHMIDT, E. 1966. Hog Cholera control and the viral Interferon between Lapinized virus and Hog Cholera virus. Congreso Panamericano de Medicina Veterinaria y Zootenia, 5, Venezuela, 1966. 9p.
94. SHEFFY, B. E.; L. COGGINS and J. A. BAKER. 1952. Relationship between Hog Cholera and Virus Diarrhea Viral of cattle. Proc. Exper. Biol. Med. (EE.UU.) 109:349-352.
95. SHOPE, R. 1958. The Swine lungworm as a Reservoir and Intermediate Host for Hog Cholera virus in lungworm infected by Ascaris

105. TEEBKEN, D. L.; J. M. AIKEN and M. J. TWIEHANS. 1967. Differentiation of virulent, attenuated, and inactivated Hog Cholera viruses by Fluorescent-Antibody Technique. Jour. Amer. Vet. Med. Assoc. 150: 53-58.
106. TENBROECK, C. 1941. Cultivation of Hog Cholera virus. Jour. Exper. Med. (EE.UU.) 74:427-439.
107. THE, T. H. and T. E. FELTKAMP. 1970. Conjugation of Fluorescein Isothiocyanate to antibodies. I. Experiments on the conditions of Conjugation. Immunology (EE.UU.) 18:865-873.
108. TIDWELL, M. A. et al. 1972. Transmission of Hog cholera virus by Horseflies (Tabanidae: Diptera). Amer. Jour. Vet. Res. 33:615-622.
109. TORLONE, V. and F. TITOLI. 1965. Attenuation of a strain of Swine virus grown on pig kidney in continuous culture. Vet. Bull. (Inglaterra) 35:630.
110. _____; F TITOLI and L.GIALLETTI. 1967. Efficacia del Vaccino Lapinizzato Ceppo Chinese, contro la Peste Suina. Vet. Ital. 18: 403-413.
111. _____. 1967.a Efficacy of a Lapinized Hog Cholera Vaccine. (Chinese Virus, strain). Vet. Ital. 18:414-420.
112. _____, et al. 1968. A strain of Swine Fever virus of attenuated on cell culture: Attenuation of Pathogenicity. Arch. Vet. Ital. 19:343-354.

113. VAN WAVEREN, G. M. 1956. Vaccination against Hog Cholera by use
of lapinized Vaccines. Bull. Off. int. Epiz. (Francia) 46:102-121.
114. YOHNSTON, R. V. 1956. New developments in Hog Cholera immunization.
Jour. Amer. Vet. Med. Assoc. 129:142-146.
115. YORK, C. J. 1961. Modified Hog Cholera viruse. Proc. Symposium
in Hog Cholera, University of Minnesota. pp.149-152.
116. YOUNG, G. A. 1952. A preliminary report on the etiology of Edema
of newborn pigs. Jour. Amer. Vet. Med. Assoc. 121:394-396.
117. _____. et al. 1955. The effect of viral and other infections of
the dam on fetal development in Swine. I. Modified Live Hog
Cholera. Immunological, and Virological and gross pathological,
studies. Jour. Amer. Vet. Med. Assoc. 126:165-171.
118. ZUFFA, A.; J. SALAJ and J. ZUFFOVA. 1970. Concerning the ability
of Bovine Diarrhea Virus to protect piglets against Swine
Fever. Vet. Bull. (Inglaterra) 40:746.