



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Evaluación de la respuesta postvacunal a Peste Porcina Clásica por medio de diferentes pruebas diagnósticas en cerdos desafiados experimentalmente

Ricardo Javier Piñeros Duque

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Maestría en Microbiología

Bogotá. D.C.

2011

Evaluación de la respuesta postvacunal a Peste Porcina Clásica por medio de diferentes pruebas diagnósticas en cerdos desafiados experimentalmente

Ricardo Javier Piñeros Duque

Código: 186276

Trabajo presentado como requisito para optar al título de

Magíster en Microbiología

Director

José Darío Mogollón Galvis

Línea de Investigación:

Virología

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Maestría en Microbiología

Bogotá. D.C. Colombia

2011

Declaración de originalidad y reconocimiento

El autor manifiesta que el presente documento es original y se realizó sin violar, transgredir y/o usurpar derechos de autor de unos terceros; por lo tanto es de exclusiva autoría y detenta su titularidad sobre la misma

Agradecimientos

A Dios por ser quien me ha dejado ver el camino que debo seguir.

Al Dr. José Darío Mogollón Galvis, director de tesis por su apoyo y guía incondicional para la realización de este trabajo y aportes en mi formación profesional y personal.

A la Asociación Colombiana de Porcicultores – Fondo Nacional de la Porcicultura, por su apoyo económico para el desarrollo de este trabajo de investigación como aporte al sector porcino Colombiano, gracias en particular al Dr. Diego Rojas y Jorge Miquet

Al Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) – Laboratorio Nacional de Diagnóstico Veterinario (LNDV) por permitirme llevar a cabo la realización de este proyecto.

A la Universidad Nacional de Colombia – Facultad de Ciencias - Postgrado Interfacultades en Microbiología por su excelente formación académica.

A mis compañeras de laboratorio en el LNDV - ICA en especial a la Dra. Andrea Castillo, Dra. Lina Pérez y Dra. Claudia Calderón por su colaboración, guía y aporte de sus conocimientos para el desarrollo de este trabajo.

A mi familia por su apoyo incondicional y en especial a mi madre.

Y a la memoria de mi padre que siempre está presente en mí.

Resumen

Evaluación de la respuesta postvacunal a Peste Porcina Clásica por medio de diferentes pruebas diagnósticas en cerdos desafiados experimentalmente

El propósito de este trabajo fue evaluar dos vacunas comerciales de Peste Porcina Clásica (PPC) utilizadas en Colombia elaboradas con la cepa China. El diseño experimental consistió en un grupo de treinta (30) cerdos provenientes de una explotación intensiva tecnificada convencional, de 50 días de edad en promedio, no vacunados a PPC, con una distribución homogénea de sexos, lo cual permitió la conformación de tres grupos: 12 animales para el grupo "A", 12 animales para el grupo "B" y 6 animales para el grupo "C". Al grupo A y B se les aplicó a cada uno una vacuna comercial y el grupo C se dejó como control. Estos animales permanecieron en unidades experimentales separadas por grupos por un periodo de 30 días, tiempo en el cual se vacunaron los animales al día 1, posteriormente a esto se desafiaron con una cepa de campo colombiana (cepa Santander) al día 16 post-vacunación. En el periodo de experimentación se tomaron diferentes muestras tales como: sangre completa, hisopados nasales, hisopados rectales y tejidos, buscando establecer la dinámica del virus vacunal y de desafío, en cuanto a la respuesta serológica, viremia, posible excreción viral y efecto biológico sobre la población experimental. Para esto se utilizaron varias metodologías diagnósticas para la detección de anticuerpos (ELISA- Ac y NPLA), antígeno (ELISA- Ag, aislamiento viral e IHQ) y detección del ácido nucleico (ARN) (RT-PCR anidada E2 y RT-qPCR 5'UTR) del virus de PPC. Se encontró que las dos vacunas confieren un alto grado de protección, generando una adecuada respuesta inmune protectora postvacunal, no producen excreción viral activa, no hubo una viremia post-vacunación evidente, limitó la excreción del virus de desafío y su aislamiento, mostrando protección evidente frente al desafío de campo con una cepa de moderada patogenicidad como lo es la cepa Santander. Se encontró además que las dos vacunas no produjeron cuadros clínicos evidentes, ni lesiones macro y microscópicas que se puedan relacionar con la acción propia del virus de PPC de tipo vacunal. Por otra parte, se evidenció que la seroconversión evaluada por ELISA comenzó a detectarse a los quince días post-

vacunación en algunos animales, no obstante en la totalidad de los animales no se evidenció la seroconversión, no se presentaron cuadros clínicos ni lesiones macro o microscópicas después del reto en los animales vacunados. De igual forma no se identificó en la totalidad de animales vacunados la distribución del antígeno vacunal, pero si el de campo después del reto en los tejidos evaluados tanto en animales vacunados como los controles. Para el caso de los animales control, se evidenció el cuadro clínico y las lesiones macro y microscópicas propias del efecto del virus de PPC, la seroconversión y la presencia del antígeno y el ácido nucleico (ARN) del virus de PPC en suero determinados por las técnicas utilizadas. Por otra parte se pudo observar que la RT-qPCR 5'UTR es una técnica más sensible para detectar el ARN viral pues facilitó la detección del virus de PPC tanto vacunal como de campo en una mayor número de animales en los tres grupos evaluados con respecto a la RT-PCR anidada E2.

Palabras clave: Peste Porcina Clásica; cepa China; vacunación; desafío

Abstract

Assessment of response to classical swine fever following immunization by different diagnostic tests in experimentally challenged pigs

The purpose of this study was to evaluate two commercial vaccines for classical swine fever (CSF) prepared with Chinese strain used in Colombia. The experimental design consisted of a group of thirty (30) pigs from a conventional swine farm, 50 days age on average without previous vaccination against classical swine fever virus (CSFV), with a gender homogeneous distribution. These animals were divided in three groups: 12 animals for the group "A" 12 animals for group "B" and 6 animals for group "C". Group A and B were vaccinated with commercial vaccines and group C was left as a control. These animals were kept in separated experimental units for a period of 30 days, at which time the animals were vaccinated on day 1, then they were challenged with a Colombian field strain (strain Santander) 16 days post-vaccination (d.p.v.). During the experimental period various types of samples such as whole blood, nasal swabs, rectal swabs and tissues were taken, in order to establish the dynamics of the vaccine virus and the challenge strain. The serological response, viremia, viral shedding and possible biological effects on the experimental population were evaluated. For this purpose, several diagnostic methods were used to detect antibodies (ELISA-Ac and NPLA), antigen (Ag-ELISA, virus isolation and IHC) and to detect nucleic acid (RNA) (nested RT-PCR - E2

and RT-qPCR 5'UTR) of CSF virus. It was found that the two vaccines conferred a high degree of protection, generating a protective immune response, they did not produce active viral shedding, and there was no clear post-vaccination viremia, and there was limited excretion of challenge virus and its isolation failed. These findings showed protection against challenge with a moderate pathogenic field strain. It was also found that the two vaccines produced no obvious clinical or gross and microscopic lesions. On the other hand, it was shown that antibodies response assessed by ELISA began at fifteen days post-vaccination in some animals; however, other animals did not show any evidence of seroconversion. There was no clinical, gross or microscopic lesion after challenge with a field strain in vaccinated animals. In addition the viral vaccine antigen was identified in some vaccinated animals but not in all of them. However, the challenge virus was detected in the tissues of both vaccinated and control animals control animals. Clinical, gross and microscopic lesions characteristic of the CSFV effects, seroconversion and the presence of antigen and nucleic acid (RNA) virus was demonstrated in the control animals. Finally it was noticed that the 5'UTR RT-qPCR, seems to be a more sensitive technique to detect viral RNA as it facilitated the detection of CSFV virus vaccine and field strain both in a greater number of animals in the three groups evaluated in comparison to nested RT-PCR of E2.

Keywords: Classical swine fever virus; Chinese strain; vaccination; challenge

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Abreviaturas y siglas	XIX
Introducción	1
Objetivos	5
Objetivo general	5
Objetivos específicos	5
1. Revisión de literatura	7
1.1 Generalidades	7
1.2 Características generales de la enfermedad	7
1.2.1 Historia de la enfermedad	7
1.2.2 Etiología	8
1.3 Características de las proteínas del virus de la peste porcina clásica (PPC)	11
1.3.1 Proteínas Estructurales	11
1.3.1.1 Proteína C	11
1.3.1.2 Proteína E ^{rns} (gp44/44/48,E0)	11
1.3.1.3 Proteína E1 (gp33) y E2 (gp55)	12
1.3.2 Proteínas no estructurales	13
1.3.2.1 Autoproteasa N ^{pro}	13
1.3.2.2 Proteína p7	13
1.3.2.3 Proteína NS2	14
1.3.2.4 Proteína NS3	14
1.3.2.5 Proteína NS4A y NS4B	14
1.3.2.6 Proteína NS5A y NS5B	14
1.4 Inmunización frente al virus de peste porcina clásica-PPC	15
1.4.1 Vacuna lapinizada con la Cepa China del virus del Peste Porcina Clásica	15
1.4.2 Seguridad de la Cepa China	16
1.4.3 Eficacia de la Vacuna con cepa China	17
1.4.4 Vacunas marcadas para el control de Peste Porcina Clásica	18
1.4.4.1. Péptidos inmunogénicos	18
1.4.4.2 Vacunas de DNA	18
1.4.4.3 Vacunas de vectores virales	19

1.4.4.4 Vacunas quiméricas de Pestivirus	19
1.4.4.5 Trans-complementos delectados de genomas de virus de Peste Porcina Clásica (replicones)	19
1.4.5 Factores de intervienen en la protección inmune	20
1.5 Evaluación de las vacunas en Colombia	21
1.6 Diagnóstico de Peste Porcina Clásica	23
1.6.1 Técnicas Diagnósticas	23
1.6.2 Evaluación clínica y macroscópica de casos de Peste Porcina Clásica	24
1.6.3 Detección de anticuerpos	25
1.6.4 Propagación viral en cultivos celulares (aislamiento viral)	27
1.6.5 Detección directa del antígeno	27
1.6.6 Detección de ácido nucleico por reacción en cadena de la polimerasa (PC)	28
1.7 Diagnóstico de Peste Porcina Clásica en Colombia	28
1.7.1 Histopatología	28
1.7.2 Diagnóstico Serológico	29
1.7.2.1 Técnica de ELISA Ac	29
1.7.2.2 Técnica de ELISA Ag	30
1.7.2.3 Prueba de seroneutralización (neutralización de anticuerpos ligado al anticuerpo - NPLA)	30
1.7.3 Aislamiento en cultivo celular	31
1.7.4 Identificación del antígeno viral en tejidos	32
1.7.4.1 Inmunoperoxidasa indirecta o inmunohistoquímica (IHQ)	32
1.7.4.2 Inmunofluorescencia directa	32
1.7.4.3 Inmunoperoxidasa directa	33
1.7.5 RT-PCR convencional	33
1.7.5.1 RT-PCR anidada para E2 y RT-PCR para 5'UTR del virus de PPC	34
1.7.5.2 RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR real time)	35
2. Materiales y métodos	36
2.1 Animales experimentales	36
2.1.1 Virus y cultivo celular	36
2.1.2 Reactivos y equipos	37
2.2 Etapas experimentales	37
2.2.1 Primera etapa	37
2.2.1.2 Análisis bioinformático de las cepas virales utilizados	38
2.2.2 Segunda etapa	39
2.2.3 Tercera epata	39
2.3 Recolección de muestras	40
2.3.1 Evaluación clínica mediante valoración de la temperatura de los animales	43
2.3.2 Evaluación clínica de los animales al momento del sacrificio	44
2.4 Procesamiento de muestras	44
2.4.1 Recolección y recuento leucocitario	44
2.4.2 Procesamiento de las muestras para diagnóstico histopatológico	44
2.4.3 Detección del antígeno de PPC	45
2.4.3.1 Identificación del antígeno viral de Peste Porcina Clásica por inmunohistoquímica (IHQ)	45
2.4.3.2 Procesamiento de las muestras de suero por ELISA- Ag (detección de antígeno de PPC)	47
2.4.3.3 Aislamiento viral	47
2.4.4 Detección de anticuerpos frente a PPC	48
2.4.4.1 Procesamiento de las muestras de suero por ELISA-Ac (anticuerpos)	49
2.4.4.2 Pruebas de las muestras de suero por seroneutralización (NPLA)	49

XIV Evaluación de la respuesta postvacunal a Peste Porcina Clásica por medio de diferentes pruebas diagnósticas en cerdos desafiados experimentalmente

2.4.5 Detección de ácido nucleico del virus de PPC por RT-PCR y RT-qPCR	50
2.4.5.1 RT-PCR anidada E2 para la detección del ácido nucleico viral en sueros, leucocitos, tejidos e hisopados nasales y rectales	50
2.4.5.2 RT-qPCR 5'UTR para la detección del antígeno en sueros, leucocitos, tejidos e hisopados nasales y rectales	51
2.4.5.3 Curva estándar de cuantificación por RT-qPCR5'UTR	
2.5 Análisis estadístico	51
3. Resultados	53
3.1 Análisis bioinformático de las cepas vacunales, cepa Alfort y cepa Santander	53
3.2 Observación clínica	54
3.3 Valoración clínica al momento del sacrificio	54
3.3.1 Valoración de la temperatura	54
3.3.2 Valoración de la condición clínica de los animales al momento del sacrificio	56
3.3.3 Recuento de glóbulos blancos	57
3.3.4 Hallazgos macroscópicos	58
3.3.5 Hallazgos microscópicos	60
3.3.6 Detección del antígeno de PPC por inmunohistoquímica (IHQ)	64
3.3.7 Detección de anticuerpos frente a PPC por medio de la utilización de la prueba de ELISA	68
3.3.8 Detección de anticuerpos frente a PPC por mediante la utilización de la prueba de seroneutralización (NPLA)	71
3.3.9 Detección de antígeno de PPC mediante la utilización de dos kits comerciales ELISA- Ag	71
3.3.10 Curva estándar de cuantificación por RT-qPCR 5'UTR	72
3.3.11 Detección del ácido nucleico de PPC por RT-PCR anidada E2 y RT-qPCR 3'UTR en sueros, leucocitos, hisopados nasales, rectales y tejidos	73
3.4 Aislamiento viral	76
4. Discusiones de resultados	79
5. Conclusiones y recomendaciones	94
5.1 Conclusiones	94
5.2 Recomendaciones	95
A. Anexo: Protocolo verificación de calidad de la vacuna de Peste Porcina Clásica utilizado por el Laboratorio de Insumos Pecuarios LANIP	96
B. Anexo: Procedimiento para la realización de inmunohistoquímica (IHQ) para la detección del antígeno de PPC	97
C. Anexo: Procedimiento para la realización de la RT-PCR anidada E2 para la detección del ácido nucleico de PPC	102
D. Anexo: Procedimiento para la realización de la RT-qPCR 5'UTR para la detección del ácido nucleico de PPC	106
E. Anexo: Interpretación de los resultados en el aislamiento de PPC	110
F. Anexo: Valoración de la temperatura diaria en los grupos experimentales	112

G. Anexo: Valoración de la condición clínica de los animales al momento del sacrificio	113
H. Anexo: Recuento de los glóbulos blancos en los diferentes momentos donde se tomaron muestras de los diferentes grupos experimentales	114
I. Anexo: Valoración y hallazgos de las lesiones macroscópicas durante la necropsia	115
J. Anexo: Valoración y hallazgos de lesiones microscópicas durante la evaluación histopatológica con microscopía de luz	116
K. Anexo: Detección del antígeno viral por la técnica de Inmunohistoquímica- (IHQ)	117
L. Anexo: Detección de anticuerpos a PPC mediante la utilización de pruebas comerciales de ELISA-Ac	118
M. Anexo: Detección de antígeno de PPC mediante la utilización de pruebas comerciales de ELISA-Ag	119
N. Anexo: Detección de ácido nucleico (ARN) de PPC por RT-PCR anidada E2 y RT-qPCR 5'UTR en tejidos, pool de bazo y ganglios linfáticos.	120
O. Anexo: Detección de ácido nucleico (ARN) de PPC por RT-PCR anidada E2 y RT-qPCR 5'UTR en sueros y leucocitos	121
P. Anexo: Aislamiento del virus de PPC en pools de tejidos linfoides en cultivos celulares PK-15	122
Bibliografía	125

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Características del genoma del virus de PPC	10
Figura 2. Árbol filogenético para analizar la relación de las cepas virales, cepas de referencia y cepa de campo utilizadas en la comparación entre genotipos y subgenotipos del virus de PPC encontradas en el GenBank	54
Figura 3. Medición de la temperatura en °C de los grupos A-B-C vacunados y desafiados.	56
Figura 4. Recuento leucocitario en los grupos A-B-C vacunados y desafiados	58
Figura 5. Cerdo 4C. Presenta hemorragias en piel y ulceraciones en las áreas articulares de las extremidades	59
Figura 6. Cerdo 4C. Presenta pleuritis (flechas negras) y epicarditis (flecha negra) fibrinosa severa.	60
Figura 7. Cerdo 4C. Tonsila, cambios depléticos en los folículos linfoides y criptitis necrótica con presencia de material exudativo en su luz – HE-100X	62
Figura 8. Cerdo 4C. Ganglio linfático, severos cambios depléticos generalizados y áreas de congestión - HE-100X	62
Figura 9. Cerdo 4C. Bazo, severos cambios depléticos generalizados en los centros germinales en áreas T y B - HE-100X	63
Figura 10. Cerdo 4C. Hipocampo, presencia de un infiltrado perivascular mononuclear y focos de gliosis, como lo indican las flechas - HE-100X	63
Figura 11. Cerdo 4C. Hipocampo, presencia de un infiltrado mononuclear y focos de gliosis, como lo indican las flechas- HE- 400X	64
Figura 12. Cerdo 6C grupo control. Pulmón, se detectó el antígeno viral (inmunomarcación) en el bronquiolo (células de la lámina propia) – Hematoxilina de Meyer - 400X	65
	65

Figura 13. Cerdo 6C grupo control. Pulmón, se detectó el antígeno viral (inmunomarcación) dentro de macrófagos alveolares - Hematoxilina de Meyer - 400X	65
Figura 14. Cerdo 6C grupo control. Membrana nictitante, observe la detección del antígeno viral (inmunomarcación) en células de las glándulas – Hematoxilina de Meyer - 100X	66
Figura 15. Cerdo 6C grupo control. Tonsila, se puede apreciar la detección del antígeno viral (inmunomarcación) en linfocitos de los centros germinales – Hematoxilina de Meyer - 400X	66
Figura 16. Cerdo 4C grupo control. Tonsila, note la detección del antígeno viral (inmunomarcación) en células de la capa epitelial de las criptas - Hematoxilina de Meyer - 100X	67
Figura 17. Cerdo 6C grupo control. Piel, note la detección del antígeno viral (inmunomarcación) en piel en células del folículo piloso y glándulas sudoríparas - Hematoxilina de Meyer - 400X	67
Figura 18. Cerdo 6C grupo control. Encéfalo, es importante observar la detección del antígeno viral (inmunomarcación) en encéfalo en la pared de los vasos sanguíneos y en el infiltrado mononuclear perivascular - Hematoxilina de Meyer - 400X	68
Figura 19. Gráfico de intervalos donde se agrupan los datos de las pruebas de ELISA-Ac (Prionics®-kit 1 y Idexx®-kit 2) para el total de los animales por muestreo	70
Figura 20. Detección de anticuerpos por ELISA Prionics® y Idexx® de los Grupos A-B-C vacunados y desafiados	70
Figura 21. Curva estandar de la RT-qPCR 5'UTR a partir del ARN de la cepa de referencia Alfort 187	74
Figura 22. Detección por RT-PCR anidada E2 en tejidos del cerdo 4C	76

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Diseño del ensayo	42
Tabla 2. Momento del sacrificio de los animales por cada grupo experimental	43
Tabla 3. Matriz de distancia para las cepas analizadas de los grupos 1.1-1.2-1.3-2.3-3.3 y 3.4 respecto a las vacunas, la cepa de referencia y de campo utilizada	54
Tabla 4. Detección del Ácido Nucleico del Virus de PPC en Pool de Sueros, Hisopados Nasales y Rectales por RT-PCR E2 y RT-qPCR 5'UTR	74
Tabla 5. Detección del Ácido Nucleico del Virus de PPC en tejidos, pool de bazo y ganglios linfáticos por RT-PCR E2 y RT-qPCR 5'UTR	76
Tabla 6. Aislamiento del Virus de PPC en pooles de tejidos linfoides en cultivos celulares PK-15	77

Abreviaturas y Siglas

INF- γ	Interferón gama
IFD	Inmunofluorescencia directa
IFA	Inmunofluorescencia indirecta
ELISA Ac	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - Ensayo de Inmunoabsorción ligado a la enzima para la detección de anticuerpos.
ELISA Ag	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - Ensayo de Inmunoabsorción ligado a la enzima para la detección de antígeno.
IHQ	Inmunohistoquímica
NPLA	Neutralización de la peroxidasa ligada al anticuerpo
PPC	Peste Porcina Clásica
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RT- PCR	Retro transcripción de la reacción en cadena de la polimerasa
RT- qPCR	Retro transcripción de la PCR en tiempo real cuantitativo

Introducción

La industria porcina en Colombia ha tenido en los últimos años un crecimiento notorio en el sector pecuario debido a un mejoramiento en la tecnificación del sector a nivel mundial, y al incremento de las necesidades de proteína de origen animal para la población humana en un crecimiento constante. Este desarrollo ha llevado a un mejoramiento y desarrollo de nuevas razas y líneas genéticas porcinas, las cuales se caracterizan por un alto rendimiento y conversión de alimento, generando carnes magras y de alto valor nutricional.

En este rápido desarrollo el sector porcino ha tenido que implementar medidas sanitarias, las cuales buscan reducir el riesgo de infección y presentación de enfermedades porcinas en explotaciones intensivas en diferentes países. Para ello, ha sido necesario realizar campañas de control y erradicación de enfermedades de tipo viral y de carácter epidémicas tales como: Peste Porcina Clásica (PPC), Enfermedad de Aujeszky, entre otras. Las cuales generan grandes pérdidas económicas, en aquellas regiones del globo donde están presentes, y muchas de estas limitan el comercio internacional de animales vivos, productos y subproductos de la industria porcina.

La Peste Porcina Clásica (PPC) o Cólera Porcino, se describió por primera vez en 1810 en Tennessee en Estados Unidos de Norteamérica. Otros autores afirman que posiblemente ocurrió por primera vez en Francia en 1822 (1).

Para los porcicultores Colombianos ha sido un enorme desafío la erradicación de PPC, la cual ha sido una enfermedad endémica en el país desde mediados de 1942. Hacia finales de los noventa el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) con apoyo de la Asociación Colombina de Porcicultores (Asoporcicultores) - Fondo Nacional de la Porcicultura (FNP), implementaron un programa de diagnóstico, prevención, control y erradicación de la enfermedad, que en la actualidad ve con buenas expectativas la

erradicación a nivel nacional, lo cual facilitaría sin lugar a dudas el acceso a los mercados internacionales (2).

La PPC es una enfermedad viral altamente infecciosa caracterizada por producir un cuadro clínico complejo en los cerdos, que dependiendo de la edad, estado inmune del individuo y características propias del virus, puede tener un desenlace fatal, llevando a la muerte a los cerdos afectados. Los animales que logran sobrevivir pueden desarrollar infecciones crónicas a veces imperceptibles, que los retrasan en su crecimiento y que muchas veces se convierten en portadores y fuente de infección para animales susceptibles.

En ciertos países latinoamericanos como México, Chile, Argentina, Uruguay y Brasil, han organizado campañas de erradicación que han llevado a la declaración de zonas libres o de países libres de PPC. Esto se ha logrado gracias a la implementación de estos programas utilizando vacunas de diferentes tipos en campañas de control y erradicación.

Actualmente en el país, se está llegando al final de un programa de control y erradicación de Peste Porcina Clásica (PPC), lo cual en el futuro le garantizará la apertura al comercio internacional de porcinos vivos, productos y subproductos de la industria porcina. Para tal efecto, la única entidad que realiza el diagnóstico y control oficial de la enfermedad es el Instituto Colombiano Agropecuario - ICA, el cual se apoya en diferentes grupos que hacen parte de la institución.

El diagnóstico de PPC en Colombia, se realiza mediante diferentes metodologías y análisis diagnósticos realizados en Laboratorio Nacional de Diagnóstico Veterinario (LNDV) del ICA, como son el reconocimiento de condición clínica en campo en casos de brotes, presentación de lesiones macro y microscópicas en tejidos evaluados, la utilización de técnicas de diagnóstico previamente estandarizadas para la detección de los anticuerpos post-exposición, detección de antígeno viral y ácido nucleico, tomadas del manual de la OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal) (64) y del laboratorio de referencia de la Unión Europea para el diagnóstico de esta enfermedad a nivel mundial (89).

Para el programa de control y erradicación de la PPC en el país, se han recomendado dos vacunas comerciales, una de origen nacional y otra importada, las cuales utilizan en común una cepa viral conocida como cepa China. Estas vacunas están constituidas por un virus atenuado adaptado a cultivos celulares, las cuales fueron previamente evaluadas en Colombia en los inicios del programa de control y erradicación.

Para la evaluación de las vacunas de PPC en Colombia, se ha seguido siempre la normatividad de la OIE, la cual establece un protocolo de evaluación como se describe más adelante (Anexo A) y cuyos criterios de evaluación principales es la inocuidad del biológico y su capacidad de protección frente al desafío con virus de PPC, medida como la supervivencia del 80% de los animales vacunados y expuestos al reto viral con una cepa de campo en forma experimental.

Debido a que el protocolo de evaluación empleado en el país de las vacunas es corto y subjetivo, se consideró importante realizar un estudio completo para poder establecer la dinámica de la distribución del antígeno vacunal de PPC en los tejidos de los animales experimentales, tiempo de permanencia y la aparición de anticuerpos, determinando la seroconversión generada por las vacunas utilizadas. De igual forma, fue de interés conocer la distribución del antígeno del virus de desafío en los tejidos evaluados, tiempo de permanencia, periodo de viremia y la aparición de anticuerpos en los animales vacunados y no vacunados.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar el posible efecto orgánico de los virus vacunales, el comportamiento de la viremia, la distribución antigénica y la detección de anticuerpos en cerdos vacunados y no vacunados contra Peste Porcina Clásica (PPC) en un desafío experimental con una cepa virulenta de campo.

Objetivos específicos

Establecer el efecto orgánico del virus vacunal y de una cepa virulenta de campo, mediante la identificación de rasgos clínicos y la presentación de lesiones macro y microscópicas y la identificación del antígeno viral.

Entender el comportamiento de la viremia en animales vacunados y no vacunados contra PPC y desafiados con una cepa de campo.

Determinar la seroconversión en cerdos vacunados contra PPC y no vacunados, frente al desafío experimental con una cepa de campo.

Establecer la posible excreción viral vía nasal y materia fecal del virus de desafío en cerdos vacunados y no vacunados contra PPC.

Contribuir en el desarrollo de una guía de uso estratégico de los métodos de diagnóstico de la enfermedad, para casos sospechosos de campo y la evaluación de las vacunas utilizadas para el control de la enfermedad.

1.Revisión de literatura

1.1 Generalidades

La Peste Porcina Clásica (PPC) o Cólera Porcino está dentro de la lista de enfermedades prioritarias transfronterizas de la Organización Mundial de Sanidad Animal-OIE, en la categoría de las enfermedades de los suidos, en la cual están incluidas las siguientes enfermedades:

- Cisticercosis porcina
- Encefalitis por virus Nipah
- Enfermedad vesicular porcina
- Gastroenteritis transmisible
- Peste porcina africana
- Peste porcina clásica
- Síndrome disgenésico y respiratorio porcino

Esto significa que son enfermedades con gran poder de distribución con especial gravedad, puesto que puede extenderse más allá de las fronteras entre países, teniendo como consecuencia cierre de fronteras y comercio dentro y fuera de los países, de animales vivos, productos cárnicos y demás derivados de la producción porcina. Además, es de carácter obligatorio la notificación de cualquier caso investigado y confirmado, por parte de las autoridades sanitarias de cada país a la OIE (3,4).

1.2 Características generales de la enfermedad

1.2.1 Historia de la enfermedad

La Peste Porcina Clásica (PPC) o Cólera Porcino, se describió por primera vez en 1810 en Tennessee en Estados Unidos de Norteamérica. Otros autores afirman que

posiblemente se presentó por primera vez en Francia en 1822 (citado por Edwards et al., 2000b) (1). Posteriormente se describió en 1830 en el estado de Ohio en Estados Unidos de Norteamérica. En 1862 la enfermedad pasó a Inglaterra, extendiéndose a los países escandinavos y después al resto de Europa. En 1903 De Schweinette y Dorset (citado por Blood et al., 1998) (5) comprobaron la etiología viral de la enfermedad, puesto que con anterioridad se creía que era producto de agentes bacterianos tales como *Salmonella choleraesuis* o *Pasteurella multocida*, agentes aislados con frecuencia cuando se presentaba la enfermedad.

En Colombia el primer brote reportado de PPC se presentó en mayo de 1942 en Cúcuta, proveniente de un brote en Venezuela, donde se observó una enfermedad febril, contagiosa y de alta mortalidad que atacaba a los cerdos sin distinción de edad, sexo y raza (ICA- Sanidad Animal, información referida sin publicar).

1.2.2 Etiología

El virus de la Peste Porcina Clásica (PPC) se caracteriza por ser un virus ARN perteneciente al género Pestivirus, familia **Flaviviridae** (6). Dentro de esta familia también se encuentran los géneros Flavivirus y Hepacivirus (7). El virus se caracteriza por tener una envoltura y proteínas de membrana glicosiladas, con un tamaño de 40-60 nm de diámetro. El genoma ARN que lo constituye es de cadena sencilla de polaridad positiva, con un peso de 12.2 kb el cual tiene un marco abierto de lectura (ORF- Open Reading Frame) que codifica 3.898 aminoácidos de 435 kDa y en la parte terminal de 11 a 12 productos finales de clivaje (NH₂- N^{pro}-C-E^{ms}-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A- NS5BCOOH) a través de un proceso co y post transduccional (8). El ARNm se traduce como una poliproteína que es clivada co y post-transduccionalmente por proteasas codificadas por el virus y por la célula hospedadora para producir las proteínas virales maduras (9,10,11,12,13).

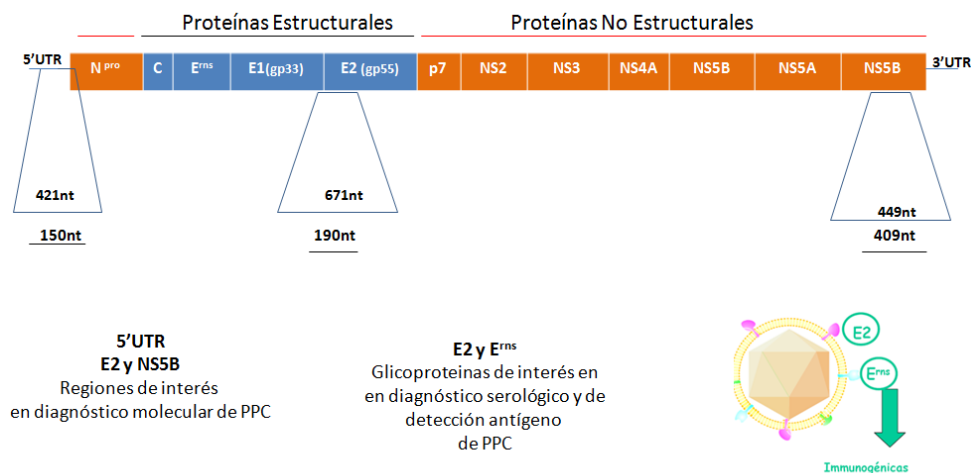
El marco abierto de lectura se inicia con el codón ATG el cual está en posición 364 a 366. El codón de terminación está en la posición 12.058 a 12.060 correspondiendo al codón TGA. El marco abierto está rodeado por regiones no codificantes (UTR - del inglés

untranslated region), una de aproximadamente de 400 nucleótidos ubicado en el extremo 5' denominado 5'UTR; y otro de 200 nucleótidos en el extremo 3' llamado 3'UTR (14). La 5'UTR regula la traducción del genoma y la 3'UTR está envuelta en la iniciación de la replicación del genoma de los Pestivirus y también está relacionada con la traducción y la replicación (15).

La cápside es de simetría icosaédrica con un diámetro de 25-35 nm, el peso molecular es de 4×10^6 Dalton. La densidad de flotación ha sido reportada entre 1.12 y 1.17 g/ml y los valores del coeficiente de sedimentación está entre 140-180S. (16). El extremo 3' está poliadenilado y el extremo 5' está bloqueado por un casquete (cap), que le da al ARN la propiedad de actuar como ARN mensajero (ARNm). El genoma viral posee una longitud de 12.284 nucleótidos.

En el género Pestivirus se incluye los virus de la Diarrea Viral Bovina (DVB) y el virus de la Enfermedad de la Frontera (BDV); virus que también pueden afectar a los porcinos. Para el caso del virus de la DVB se ha reportado protección cruzada contra PPC, ya que los Pestivirus son estructural y antigénicamente muy relacionados (11,17).

Actualmente se conoce la organización del genoma del virus de la PPC la cual ha permitido describir la posición exacta de los genes que codifican para las distintas glicoproteínas virales (13). El virión está compuesto por las proteínas de la capsida o estructurales las cuales son la proteína C, E^{ms}, E1 y E2 y por proteínas no estructurales como los son la N-terminal (Npro), p7, NS2-3 (NS2-NS3), NS4A, NS4B y NS5B, NS5A y NS5B, tres de ellas glicosiladas, que forman parte de la envoltura viral con la E0 o E^{ms} (gp44/48), la E1 (gp63) y la E2 (gp55) y la p7 (18). La E1 es una proteína transmembranal que posee menor inmunogenicidad que la E2. La E0 y la E2 forman dímeros unidos por enlaces disulfuro, característica que le confiere a la envoltura una composición muy particular no observada en otros virus ARN distintos a Pestivirus. Por otra parte, algo importante es que inducen anticuerpos neutralizantes (13). La E0 o E^{ms} esta asociada con la envoltura y es necesaria en la infección viral (19,20,21) (Figura 1).



Fuente: Genetic typing of classical swine fever virus – Paton et al., (2000) (77)

Figura 1. Características del genoma del virus de PPC.

La replicación viral ocurre en el citoplasma celular y se han observado partículas infecciosas a las 10 horas post-infección, que posteriormente al ser liberadas adquieren una envoltura lipídica lábil, que contiene componentes de la célula hospedadora. Se conoce un solo tipo antigénico, pero existe variación en la virulencia de las cepas, las cuales a su vez causan las diferencias en los signos clínicos; algunas son altamente virulentas, como las que llevan a la muerte a todos los cerdos sin importar la edad, moderadamente virulentas cuando causan una enfermedad subaguda en los lechones infectados después del nacimiento pero que también causan anomalías y las cepas avirulentas, que no afectan los fetos cuando ocurre transmisión vertical (16).

El modo de transmisión de la enfermedad es principalmente por contacto de animales sanos con animales enfermos por PPC, siendo las secreciones y demás fluidos corporales la principal fuente de contagio incluyendo el semen. Se ha encontrado que vectores mecánicos como operarios, artrópodos, pájaros, mascotas y roedores pueden transmitir la enfermedad. De igual forma se ha observado que dependiendo de la virulencia y excreción de los virus de campo, se puede presentar la transmisión vía aerógena como lo refiere Weesendorp et al., 2009 al citar a Elbers et al., 1999, los cuales sugieren que la transmisión por esta vía se puede dar hasta en una distancia de 1 km de radio del foco primario (92).

La principal ruta de ingreso es la vía oral llegando el virus a la tonsila, donde se replica y transporta a los ganglios linfáticos locales vía linfática (generalmente los submandibulares), luego vía sanguínea o linfática se distribuye por todo el cuerpo. La infección causa severa leucopenia e inmunosupresión en todas las líneas celulares tanto linfoide como mieloide, lo cual predispone a los cerdos para que sufran infecciones secundarias tanto virales como bacterianas complicando el cuadro clínico de la enfermedad. El virus también tiene la capacidad de generar cuadros hemorrágicos afectando varios tejidos producto de la trombosis y daño en el endotelio vascular. Las lesiones macroscópicas son principalmente hemorragias con presencia de petequias o equimosis en la mayoría de los órganos (13).

1.3 Características de las proteínas del virus de la peste porcina clásica (PPC)

1.3.1 Proteínas Estructurales

1.3.1.1 Proteína C

Esta proteína en el genoma viral sigue a la N^{pro}, está constituyendo la nucleocápside del virión. Es un polipéptido de 14 kDa el cual está altamente conservado en los virus de PPC. Se piensa que sirve como secuencia señal de inicio de la translocación de la proteína E^{ms} al lumen del retículo endoplásmico (12,19).

1.3.1.2 Proteína E^{ms} (gp44/44/48, E0)

Se define como proteína esencial para la infección celular, al igual que la E1 y E2 puesto que son necesarias para la absorción celular (12,23,24). Esta proteína tiene una actividad ribonucleasa con especificidad por residuos de uridina, que parece ser importante en el ciclo replicativo del virus (23). Se trata de una proteína fuertemente glicosilada, forma homodímeros unidos por puentes disulfuro y se puede encontrar asociada no covalentemente con partículas virales libres, o secretadas en el medio de cultivo (21). Los anticuerpos que inhiben la actividad ribonucleasa también tienden a neutralizar la infección viral y se sabe que cambios en esta proteína destruyen la

actividad ribonucleasa que da origen a cepas de virus que podían ser más citopáticas en cultivos, pero atenuadas *in vivo* (25). Esta proteína ha demostrado ser tóxica para linfocitos *in vitro*, lo cual se relaciona con la marcada leucopenia en infecciones naturales, llevando a un estado de inmunosupresión en animales enfermos (12,19). Otro aspecto importante es la inhibición de la proliferación de linfocitos y la síntesis de proteínas debido a una inducción de la apoptosis, lo cual se traduce en leucopenia e inmunosupresión.

La E^{ms} se ha encontrado que es blanco de los anticuerpos neutralizantes induciendo una inmunidad protectora frente al virus de PPC y es esencial para la unión del virus y su translocación a través de la membrana plasmática, lo cual se considera necesario para la infección de las células eucariotas por parte de los Pestivirus (26). E^{ms} y E2 presentan cuatro sitios de selección positiva (epítopes) que estarían determinando la patogenidad y virulencia de las cepas, lo cual sí se estudiara más a fondo permitiría ayudar a predecir la virulencia de nuevas cepas, tal como la respuesta inmunológica de ciertas cepas a las vacunaciones (27).

1.3.1.3 Proteína E1 (gp33) y E2 (gp55)

Son proteínas de membrana que contienen respectivamente dos a tres, y cuatro a seis sitios de glicosilación. Las proteínas E1 y E2 están asociadas como heterodímeros unidos por puentes disulfuro; pero la proteína E2 también se encuentra como homodímero. Experimentalmente la E2 recombinante del virus de PPC se puede unir a las células y bloquear la infección por otros Pestivirus al bloquear la unión y entrada a la célula (12,19, 21).

La proteína E2 es la principal glicoproteína de la envoltura viral y es considerada la más inmunogénica, siendo esta inmunodominante en los Pestivirus (28). De igual forma esta proteína ha permitido subdividir los Pestivirus en cuatro o seis grupos por sus características neutralizantes, las cuales se han relacionado con sus diferencias genéticas (29). Por otra parte es esencial para la unión y entrada a la célula. Recientemente se ha determinado su accionar en la variable virulencia del virus, ya que en diferentes cepas aisladas en China y estudiando la E2 con respecto a la virulencia se estableció una alta correlación en cuanto a su variación en cepas altamente patógenas

(30,31,32). También se reconoce que es la más inmunogénica de todas las proteínas, ya que induce una cantidad considerable de anticuerpos neutralizantes (33).

La E2 está codificada por un gen de aproximadamente 1200 nucleótidos, el cual incluye regiones altamente variables especialmente hacia el extremo 5', donde se encuentran los genes que codifican los principales epítopes antigénicos del virus. La proteína está compuesta por al menos cuatro de estos dominios antigénicos, tres de los cuales dan origen a la producción de anticuerpos neutralizantes por parte del hospedador. Los anticuerpos generados frente a esta glicoproteína E2 son neutralizantes para el virus y están dirigidos contra epítopes localizados hacia el extremo amino de la proteína. La mitad de la N terminal de la E2 es una de las regiones más variables del genoma del virus de PPC (28,29). Esta proteína es la de mayor uso en el desarrollo de vacunas y en el desarrollo de herramientas diagnósticas de tipo molecular, pero eventualmente es una desventaja por la reacción cruzada entre los Pestivirus, frente a su utilización en las herramientas serológicas como las ELISAs y la NPLA.

1.3.2 Proteínas no estructurales

1.3.2.1 Autoproteasa N^{pro}

Es una proteína no estructural codificada en el ORF, que se encarga de realizar el clivaje en el sitio N^{pro}/C. Esta enzima cliva la secuencia C-terminal Cys-Ser, la cual es conservada en los Pestivirus. La función de esta proteína es la autoproteólisis para las nacientes poliproteínas y tienen una función antagonista en las vías de inducción del INF- α/β (19,21,25,34).

1.3.2.2 Proteína p7

La proteína p7 está unida con la E2 y contiene una región cargada que separa los extremos hidrofóbicos. Esta proteína no es completamente clivada y permanece asociada a la célula junto con la E2, E2-p7 pero su integridad no es necesaria para la replicación viral, ya que se ha observado que su separación antes de entrar al retículo endoplásmico resulta en partículas virales viables (35). La proteína p7 contiene una secuencia de aminoácidos cargados, la cual está dirigida hacia el citosol durante la maduración viral y se cree que interactúa con la proteína de la cápside para iniciar el proceso de gemación de los viriones (36).

1.3.2.3 Proteína NS2

La NS2 y NS3 son necesarias para el ciclo viral. La proteína NS2, de aproximadamente 54 kDa, está presente como la porción amino terminal de NS2-3 (125 kDa). El papel de esta proteína es desconocido, salvo alguna actividad reportada en el procesamiento de la NS2-3 (12).

1.3.2.4 Proteína NS3

Tiene actividad helicasa con un dominio serina proteasa amino terminal seguido por motivos característicos de las ARN-helicatas. La actividad proteasa de la NS3 y probablemente de la NS2-3 requiere de la NS4A como cofactor de la proteína. Se ha demostrado que la serina proteasa, cliva entre leucina y pequeños aminoácidos no cargados (12). Por otra parte tiene una actividad de helicasa y NTPasa que son esenciales para la replicación viral (34).

1.3.2.5 Proteína NS4A y NS4B

Estas dos proteínas son hidrofóbicas y relativamente pequeñas (16 kDa y 27 kDa respectivamente) y se encuentran asociadas a membrana. NS4A tienen una actividad cofactora de la NS3, lo cual implica una interacción entre el dominio central de esta proteína y la región amino terminal de la NS3 (12). La NS4A es indispensable para el clivado de la NS2-3 en la formación de partículas infecciosas, por otro lado la NS4B tiene un efecto de citopatogenicidad (34).

1.3.2.6 Proteína NS5A y NS5B

Estas proteínas están presentes como productos maduros del clivaje proteolítico con pesos de 58 kDa y 75 kDa respectivamente, pero también se pueden encontrar en su forma no clivada NS5AB. Se desconoce un poco de la función de NS5A. Esta proteína es fosforilada por una serina/treonina kinasa que tiene propiedades similares a las enzimas que fosforilan la NS5 de los Flavivirus y Hepacivirus. La NS5B contiene características de ARN polimerasas dependientes de ARN y junto con la NS3 son necesarias para la replicación del RNA (12,37,38,39,40,41,42).

1.4 Inmunización frente al virus de peste porcina clásica-PPC

Muchos son los procedimientos que se han utilizado durante las últimas décadas para combatir esta enfermedad en diferentes países. A partir de los años 60, las vacunas vivas utilizadas, tanto lapinizadas por sucesivos pases en conejo, como otras cepas atenuadas propagadas en cultivos celulares han tenido particular importancia. Las vacunas lapinizadas fueron mejoradas a mediados de los 60, utilizando ya cepas totalmente lapinizadas y carentes de efectos teratógenos, las cuales han permitido conjuntamente con otras obtenidas por pases en cultivos celulares, la eliminación de la enfermedad de los países de la actual Unión Europea entre los años 1970 y 1980 (43).

En la actualidad, las vacunas más utilizadas en diferentes programas de control de la PPC son las vacunas vivas atenuadas, provenientes del virus vacunal conocido como cepa China y cepa Thiverval. En Colombia en lo referente a la PPC, a mediados de los noventa y hasta la fecha en los programas de control y erradicación se ha trabajado con la cepa China.

Recientemente, varios tipos de nuevas vacunas han sido desarrolladas, como lo son la vacuna E2 basada en un péptido sintético (85), vacuna de subunidades, vacunas de vectores a virus vivo (86) y vacunas genéticas (87). Estas vacunas pueden conferir parcial o completa protección frente al virus de desafío, pero son inferiores a la cepa China, especialmente en prevenir la excreción y distribución de los virus virulentos (44).

1.4.1 Vacuna lapinizada con la cepa China del virus de Peste Porcina Clásica

Se trata de una cepa lapinizada denominada también cepa Suvac "C" y "K". Su origen es desconocido y según varios autores podría tener cerca de 480 pases en conejo, la cual se desarrolló a mediados de 1950 en la China (44). La cepa que se utiliza en la actualidad no presenta virulencia residual, siendo totalmente apatógena incluso para madres gestantes y lechones. Tiene una rápida actividad protectora al inducir inmunidad, presenta interferencia viral con el virus patógeno. La vacuna se ha caracterizado por su alta eficacia, confiriendo a los animales una inmunidad de amplio espectro, algunas

veces de por vida, protección consistente tanto en inmunidad celular como humoral, contra genotipos y subgenotipos del virus. Los anticuerpos maternos derivados de la inmunización de las madres pueden conferir sólida protección a la progenie; pero se ha probado la inhibición de esta actividad en animales vacunados con la cepa China por la interferencia de anticuerpos maternos (44).

1.4.2 Seguridad de la cepa China

Los cerdos inmunizados con cepa China desarrollan únicamente fiebre moderada y una viremia efímera. La inmunización de cerdas de uno a tres meses de preñez no resulta en mortinatos o abortos. Cuando se vacuna los lechones con la cepa China no se perciben problemas de salud (45).

Además, existe la poca probabilidad de que la cepa China haga reversión a virulencia, cuando es sometida a una serie de pasajes (20-30 pasajes) en cerdos, lo cual garantiza su seguridad en el uso frecuente en campo (45,46,47).

En general, se considera que no ocurre transmisión vertical de las madres a sus descendencias después de la vacunación con la cepa China (48). Sin embargo, otros reportes sugieren que la cepa China ocasionalmente induce transmisión transplacentaria al feto, pero no resulta en enfermedad, inmunotolerancia o desarrollo anormal del feto (49,50).

La replicación de la cepa China esta limitada al tejido linfoide y ocasionalmente en otros tejidos como riñón, pero excede su permanencia a tres semanas en la tonsila (51,52). Se han detectado bajas cantidades del virus en el bazo y la médula ósea a los 7 días post-vacunación pero prácticamente no se detecta en sangre, bazo y médula ósea a los 17 días post-vacunación (45).

Las vacunas derivadas de diferentes sistemas de propagación difieren en la replicación viral. En un estudio realizado en cerdos inoculados con cepa China producida en conejos y en cultivos celulares MPK, se intentó detectar el virus en sangre y en muestras de tejido mediante la utilización de un kit comercial de ELISA-Ag y RT-PCR anidada. La cepa China producida en cultivo celular solo se encontró en un encéfalo de los animales

experimentales con respecto a la producida en conejos, la cual fue detectada en el 70% de los encéfalos de los animales inoculados experimentalmente (52).

La vacunación con cepa China en forma oral ha sido segura y efectiva. El virus vacunal puede no ser detectado en las secreciones nasales, ni en materia fecal entre los 2-12 días post-vacunación vía oral, pero pudo detectarse en órganos (tonsila, nódulos linfoides mandibulares y bazo), hasta 8 días post-vacunación en cerdos domésticos y únicamente en tonsila hasta el 9 día post-vacunación en cerdos salvajes. Se ha reportado que la cepa China no fue detectada en cerdos salvajes más haya de los 10-12 días después de la vacunación vía oral (53).

1.4.3 Eficacia de la vacuna con cepa China

Muchas investigaciones en la literatura existente han mencionado una eficiencia de la cepa China alrededor de un 100%, en diferentes modelos de desafío usados. Las investigaciones indican que los cerdos pueden producir una fuerte respuesta inmune 72 horas post-vacunación con cepa China. La duración de la inmunidad puede llegar hasta el año y medio. La dosis mínima de inmunización para cepas lapinizadas es de 10^5 para la cepa China de bazos de conejo, 10^4 - 10^5 de ganglios linfáticos, y 10^2 – 10^3 de la sangre, encontrándose una completa protección una semana post-vacunación frente a una cepa patógena en un desafío 2-4 d.p.v. (días post-vacunación) (Kaden y Glaner 1982; Lai et al., 1982, citados por Qiu et al., 2006) (45). Los anticuerpos neutralizantes usualmente se producen dos semanas post-vacunación y se incrementan continuamente persistiendo de 4 a 12 semanas post-vacunación (Precausta et al., 1983, citado por Qiu et al., 2006) (45,91).

En brotes de PPC y condiciones en los cuales se requiere una urgente vacunación, la cepa China provee inmunidad contra la enfermedad, disminuyendo la replicación eficiente del virus de campo en los animales vacunados, disminuyendo la transmisión del mismo, permitiendo producir una buena inmunidad poblacional. Es decir, que la utilización de vacunación con cepa China en emergencias generadas por brotes no solamente provee inmunidad contra la enfermedad, sí no que también disminuye la replicación eficiente del virus infeccioso en los animales enfermos reduciendo o deteniendo la transmisión del virus de campo, permitiendo el control de brotes (44).

1.4.4 Vacunas marcadas para el control de Peste Porcina Clásica

Hoy en día dada la necesidad de poder hacer la diferenciación entre anticuerpos por infección natural o por vacunación cuando se utilizan cepas vivas atenuadas como es el caso de la cepa China, se ha desarrollado y producido vacunas genéticamente modificadas las cuales permiten hacer la diferenciación de anticuerpos por infección y por vacunación. Para lograr se ha hecho uso de la ingeniería genética produciendo varios constructos que permiten hacer esta diferenciación como lo son: (1) Péptidos inmunogénicos para Peste Porcina Clásica, (2) Vacunas de DNA, (3) Vectores de expresión de proteínas virales, (4) Pestivirus quiméricos y (5) Trans-complementos delectados de genomas de virus de PPC (replicones), los cuales permiten generar inmunidad y diferenciación de anticuerpos (54,91).

Estas vacunas modificadas como es el caso de las vacunas de subunidades basadas en expresión de la proteína E2 en baculovirus, han sido ampliamente estudiadas, pero se ha encontrado que la respuesta inmune es menor y brinda bajos niveles de protección frente al desafío viral con PPC, comparada con las vacunas vivas atenuadas (54).

1.4.4.1. Péptidos inmunogénicos

Se han utilizado partículas inactivadas del virus, subunidades basadas en proteínas recombinantes o también llamadas péptidos inmunogénicos, los cuales pueden ser usados para la elaboración de vacunas, pero se ha encontrado que las vacunas elaboradas con péptidos frente al virus de PPC fallan en proveer una completa protección. Los cerdos inmunizados con vacunas de péptidos como la E2 permiten diferenciar los animales infectados frente a PPC mediante una prueba de ELISA que detecta anticuerpos específicamente contra la E^{ms}, presentes en las cepas de campo y no en las vacunas de subunidades (54). Estas vacunas como tal no hacen parte de las vacunas marcadas, pero permiten una diferenciación a la respuesta serológica generada por las cepas de campo, algo similar a las vacunas marcadas.

1.4.4.2 Vacunas de ADN

Consiste en la utilización de plásmidos como vectores, los cuales contienen el gen que codifica la proteína E2 del virus de PPC. Las células captan estos plásmidos expresando

la proteína en su superficie, pero se ha demostrado que para que se cumpla su acción protectora se requiere de altas dosis y varias aplicaciones para una total protección frente a un desafío experimental (54).

1.4.4.3 Vacunas de vectores virales

Se ha utilizado el virus de la vaccinea como vector viral expresando en su superficie la proteína E2 y E^{ms}, debido a que son las más inmunogénicas. En los últimos años, se han probado experimentalmente varios sistemas de vectores basados en la utilización del virus de Pseudorabia, Adenovirus Porcino, Viruela Porcina, Paramixovirus, expresando la glicoproteína E2. Estas vacunas se han utilizado en la inmunización de cerdos mostrando protección frente a la infección por virus de PPC y la presentación de signos clínicos. Las desventajas de este tipo de vacunas es que solamente presentan protección en aplicaciones parenterales en un 100% más no en la forma oral para la inmunización en porcinos silvestres, ya que solo se logra una protección del 60% (54).

1.4.4.4 Vacunas quiméricas de Pestivirus

Para el caso del virus de PPC, se basa en el reemplazo de las secuencias de genes que codifican las regiones antigénicas como E2 o E^{ms} por secuencias análogas del virus de Diarrea Viral Bovina tipo 2 (DVB). Los cerdos vacunados con este tipo de vacunas presentaron completa protección frente a la infección del virus de PPC y DVB, sin que se observe transmisión entre animales contacto ni excreción viral (54).

1.4.4.5 Trans-complementos delectados de genomas de virus de Peste Porcina Clásica (replicones)

Se fundamenta en la replicación autónoma después de la transfección del virus de PPC dentro de células SK 6 mutantes con delección en los genes que codifican las proteínas E^{ms} y E2 en el virus, sin la producción de progenie viral (replicones). La desventaja de este tipo de vacunas radica en la ruta de aplicación, ya que los únicos datos satisfactorios para este tipo de vacunas, es cuando se hace la aplicación de forma intradermal (54).

1.4.5 Factores que intervienen en la protección inmune

Hasta el momento se ha generado un volumen significativo de información sobre los mecanismos de protección producidos por las vacunas elaboradas a partir de la cepa China. Se ha comprobado que las vacunas elaboradas con esta cepa son muy seguras en su utilización en porcinos de todas las edades. Por lo general, la vacuna usualmente induce anticuerpos neutralizantes detectables en animales vacunados 2-3 semanas después de la primera vacunación (55,56). La cepa China induce niveles significativos de INF- α a partir de leucocitos periféricos después de la estimulación viral los cuales alcanzan un pico máximo a los 9 días post-vacunación y persistiendo hasta 21 días aproximadamente. Estos hallazgos sugieren que la inmunidad celular es responsable de la protección en los primeros días post-vacunación mientras que aparecen los anticuerpos neutralizantes (57,58).

Se debe tener en cuenta que hay factores que intervienen con la protección que puede generar las vacunas elaboradas con la cepa China. Entre los factores que intervienen en la inmunidad protectora se encuentran: (1) Diferentes intervalos entre la exposición y la vacunación. Los anticuerpos neutralizantes no son funcionales sino hasta los 10 días post-vacunación; (2) Diferentes tipos y títulos de la vacuna. Las vacunas elaboradas con la cepa China, preparadas en diferentes tipos de cultivo pueden tener diferencias en la inducción de anticuerpos neutralizantes, al igual que las vacunas de subunidades virales; (3) Existen diferentes parámetros de evaluación de la eficacia y para ello es necesario la caracterización de la correlación inmunológica con la eficacia de la vacuna; (4) Diferentes virus de reto y dosis de utilización. (5) Muchos otros factores se han atribuido a las fallas en la vacunación, pero nunca estos se han atribuido a la vacuna por sí misma. Entre ellos se encuentran, la interferencia generada por los anticuerpos maternos y los efectos inmunosupresores producidos por otros agentes virales (Aujeszky, PRRS, y PCV2), y la exposición a micotoxinas, ya que tienen un efecto negativo sobre la modulación del sistema inmune, lo cual interfiere con la efectividad de los protocolos de vacunación contra PPC (61). Importante resaltar que los lechones tienen pleno desarrollo del sistema inmune a las cuatro semanas de edad, lo cual garantiza una adecuada respuesta inmune a las vacunas confiriéndoles una adecuada protección. (44).

Para el caso de la inmunidad materna adquirida por el lechón a través del calostro, se ha establecido que esta desciende cerca de la mitad a las dos semanas de vida. Se ha comprobado que animales vacunados con títulos menores de $\leq 1:32$ presentan óptima protección cuando son vacunados presentando estos títulos de anticuerpos maternos. Si estos títulos de anticuerpos son superiores, se ha encontrado que se ve afectada la protección conferida por la vacuna, quedando los animales desprotegidos, puesto que se ha observado experimentalmente que no presentan seroconversión ni a la vacuna ni a la exposición viral de campo. Por otra parte, títulos de anticuerpos maternos mayores a 1:256 confieren completa protección en lechones pero su descenso paulatino pone en riesgo el nivel de protección (59,60).

1.5 Evaluación de las vacunas en Colombia

La primera investigación en el país sobre la evaluación de la vacuna de PPC fue realizada por Villamil et al., en 1997 miembros de Instituto Colombiano Agropecuario – ICA, y para tal efecto, se desarrollaron varios experimentos cuyo objetivo fue evaluar la calidad de tres biológicos, mediante pruebas de inocuidad y potencia. Dentro de los hallazgos importantes de este estudio, se encontró la persistencia del virus vacunal a nivel de las tonsilas hasta los 35 días post-vacunación mediante la prueba de IFD para el total de las vacunas evaluadas. No se pudo determinar con exactitud en qué momento desaparecía el antígeno vacunal de las tonsilas ya que el experimento se realizó hasta los 35 días post-vacunación (62).

Para este estudio también se utilizó la ELISA-Ceditest®-CSFV competitiva para la detección de anticuerpos, al día cero mostrando seronegatividad para todos los animales. Las tres vacunas evaluadas mostraron un 100% de protección y presentaron seroconversión positiva por la prueba de ELISA encontrándose que los anticuerpos contra el virus de la PPC comenzaron a detectarse a partir de los 14 días post-vacunación para el caso de la vacuna 1 y a los 21 días con las vacunas 2 y 3. A los 35 días post-vacunación, en solo el 50% de los animales del total de los grupos se detectó anticuerpos por medio de esta prueba. Con relación a la inocuidad, en ningún grupo vacunado se observaron reacciones desfavorables locales y/o sistémicas derivadas o atribuibles a la aplicación del producto.

Con relación al registro de la temperatura, de acuerdo con las mediciones en la mañana y en la tarde, únicamente el día 4, se observaron diferencias significativas $p (<0,05)$ en los tres tratamientos. Por otro lado, teniendo en cuenta la temperatura diaria, se encontraron diferencias significativas $p(<0,05)$ el día 3 post vacunación entre el grupo 3 y el grupo de control y el día 12 post vacunación entre los tres grupos vacunados y el grupo control.

Ninguno de los animales de los grupos vacunados presentó signos clínicos de PPC durante el periodo de observación post-desafío; por lo tanto el porcentaje de protección encontrado fue del 100% para las tres vacunas estudiadas. Sin embargo, cabe anotar que durante el experimento, tres animales (dos del grupo 2 y uno del grupo 3) presentaron signos respiratorios, depresión y fiebre ligera.

Por otro lado, a través de la histopatología se confirmó la patogenicidad de la cepa utilizada para el desafío y demostró la presencia de este antígeno en la tonsila de los animales enfermos mediante la IFD y la técnica SERELISA HCV Ag.

Como hallazgos importantes para estos investigadores, encontraron que por lo menos un mes post-vacunación no sería posible diferenciar entre el virus de campo y el virus vacunal de la PPC por medio de la prueba IFD, siendo necesario tener en cuenta un diagnóstico presuntivo de la enfermedad, lo cual ameritaría la realización de pruebas complementarias y tener en cuenta el plan de vacunación, para dar un diagnóstico positivo de un caso de PPC (62).

En años recientes, la evaluación de la vacuna en el Laboratorio Nacional de Diagnóstico Veterinario del ICA, se realiza por RT-PCR anidada para la detección del segmento genómico E2 en muestras de tonsilas y por medio de la evaluación histopatológica, teniendo en cuenta el número de animales que sobreviven al reto de campo, el cual debe ser de un 80% en la población vacunada desafiada.

1.6 Diagnóstico de la Peste Porcina Clásica

En la actualidad se cuenta con varios métodos a nivel mundial para la identificación de anticuerpos, antígeno y ácido nucleico (ARN) del virus de PPC. Por ser esta una enfermedad de control oficial en la gran mayoría de países del mundo, hoy en día se encuentran descritas las técnicas de diagnóstico en el Manual de la Organización de Sanidad Animal-OIE, entidad que rige la sanidad animal a nivel internacional. El propósito de este manual de animales terrestres es facilitar el comercio internacional de animales y productos, así como contribuir a la mejora de los servicios de salud animal en todo el mundo. Mediante la descripción de los métodos de laboratorio para el diagnóstico de enfermedades y los requisitos para la producción y control de productos biológicos (principalmente vacunas), ambos consensuados internacionalmente, se pone de manifiesto lo que constituye el objetivo del manual: la armonización de los elementos fundamentales de la prevención, vigilancia y control de las enfermedades animales (64).

1.6.1 Técnicas Diagnósticas

Para el diagnóstico de los Pestivirus hay que tener en cuenta la relación antigénica de los virus pertenecientes a este género, ya que se ha observado reacción cruzada en las pruebas de inmunodifusión, inmunofluorescencia y en menor grado las pruebas de neutralización. Ciertas cepas de PPC inducen anticuerpos neutralizantes al virus de Diarrea Viral Bovina (DVB) y Enfermedad de la Frontera y estos a su vez para PPC. Los antígenos comunes entre Pestivirus residen principalmente en la proteína no estructural NS2-3 (65).

La presentación de cuadros clínicos típicos de PPC en campo, permite hacer una aproximación al diagnóstico, de acuerdo con la sintomatología, lesiones a la necropsia, cronología del episodio y demás factores epidemiológicos que permiten establecer la posible presentación de PPC en campo. Se debe tener en cuenta la realización de diagnóstico diferencial con otras entidades virales como Peste Porcina Africana, Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS) y entidades bacterianas que cursan con cuadros septicémicos y toxémicos agudos como Salmonelosis, Pasteurellosis, Estreptococosis, Erisipelas o Infecciones por *Haemophilus parasuis* (16). Estas enfermedades tienden a producir un cuadro sistémico porcino similar a PPC, por tal motivo siempre se debe pensar en un diagnóstico diferencial cuidadoso.

Es importante confirmar el diagnóstico por pruebas de laboratorio basadas ya sea en la detección del antígeno viral, el aislamiento viral, demostración de anticuerpos neutralizantes o de la presencia del genoma viral. Para esto, las muestras de tejidos apropiadas son tonsila, bazo, riñón, ganglios linfáticos y parte terminal del íleon. Las técnicas más utilizadas son la seroneutralización (NPLA), ELISA para la identificación de antígenos o anticuerpos, inmunofluorescencia directa, inmunoperoxidasa, inmunohistoquímica (IHQ), RT-PCR y RT-qPCR y el aislamiento viral siendo esta última la técnica "estándar de oro" (64).

1.6.2 Evaluación clínica y macroscópica de casos de Peste Porcina Clásica

La clínica y los hallazgos patológicos del virus de PPC pueden ser muy variables y enmascarados por otras enfermedades porcinas. La severidad de los signos principalmente depende de la edad de los animales y la virulencia de la cepa viral (88). Usualmente, los animales jóvenes son los más afectados en relación a los animales adultos en donde muchas veces el curso de la enfermedad es moderado y subclínico presentándose animales portadores crónicos.

Recientemente se han establecido protocolos de evaluación macroscópica de los hallazgos de brotes de casos sospechosos en campo los cuales permiten hacer una estimación a los clínicos si se trata de un caso compatible con PPC.

La evaluación de los signos clínicos en epidemias de PPC puede ser una herramienta valiosa en el diagnóstico de la enfermedad, de acuerdo con el reporte realizado por Elbers et al., 2002 (81), quienes sugirieron un valor de sensibilidad del 72.7% y uno de especificidad del 52.7% entre la combinación de los siguientes hallazgos clínicos para los casos de PPC: pasos inestable, ataxia, no consumo de alimento, conjuntivitis y materia fecal dura. Estos son los hallazgos más frecuentes los cuales pueden tener un valor importante en la clínica y en el diagnóstico de casos de PPC en la presentación epidémica de la enfermedad.

En un estudio realizado en Holanda, se tomaron 1072 individuos de 230 granjas con infección con PPC, en brotes ocurridos en 1997/1998. A su vez se incluyeron 1224 individuos infectados y 241 no infectados en este estudio. Los hallazgos más frecuentemente encontrados fueron: neumonía, pleuritis, bronquitis crónica, edema pulmonar, úlceras gástricas crónicas, conjuntivitis, hemorragias en la pelvis renal, hemorragias renales, esplenomegalia, hemorragias en la vejiga urinaria, hemorragias y aumento del tamaño de los ganglios linfáticos. Sin embargo, la neumonía y la pleuritis, se encontró distribuida en animales infectados y no infectados, lo cual resultó en un hallazgo de alta sensibilidad combinado con baja especificidad (83).

El reconocimiento de las lesiones macroscópicas en campo también juega un papel importante en la identificación de casos producto de la infección por el virus de PPC. La evaluación post-mortem de tonsila, bazo, válvula íleo-cecal y pelvis renal, enviados a laboratorios de diagnóstico para la detección del antígeno viral por inmunofluorescencia directa, es una prueba de confirmación con un alto valor diagnóstico (66).

Hoy en día se ha encontrado que las cepas de alta virulencia, responsables de cuadros clínicos severos y caracterizados por la presentación de cuadros hemorrágicos han desaparecido y han sido reemplazadas por cepas de moderada o baja virulencia, las cuales producen formas de enfermedad subagudas, crónicas o inaparentes. Estos tipos de virus producen un espectro de enfermedad que es más difícil de reconocer clínica y patológicamente, haciendo que la confirmación de casos por laboratorio sea esencial (79).

1.6.3 Detección de anticuerpos

El diagnóstico serológico es usado para el diagnóstico y la vigilancia cuando se sospecha de la presencia del virus de PPC en la población porcina principalmente en poblaciones libres de la enfermedad y sin vacunación. Los anticuerpos son detectados por primera vez 2-3 semanas después de la infección permaneciendo por un periodo largo de vida en aquellos animales que sobreviven. La presencia de anticuerpos es un buen indicador de que ha habido una infección por PPC en los hatos porcinos en aquellas zonas donde no se vacuna. Las pruebas de uso común son la neutralización viral y las técnicas de inmunoensayo como las ELISAs.

La neutralización viral (NPLA) prueba estándar, es una técnica que no permite diferenciar la infección por otros Pestivirus, ni permite realizar la diferenciación de anticuerpos generados por infección o vacunación, con vacunas vivas atenuadas o modificadas. Para el caso de las ELISAs (indirecta o de bloqueo) en general presentan alta sensibilidad pero baja especificidad, presentando reacción cruzada con la identificación de anticuerpos frente a otros Pestivirus. Esto no sucede para el caso de la detección de anticuerpos con vacunas de subunidades marcadas, en donde se han desarrollado kits de ELISAs para este tipo de vacunas (66). Las pruebas serológicas como lo son las ELISAs y la NPLA, son pruebas serológicas reconocidas internacionalmente para la certificación de zonas libres y útiles para el caso de epizootias. La desventaja de estas pruebas es el tiempo requerido para que los animales seroconviertan, ya que los anticuerpos solo se detectan hasta la tercera semana post-infección (79).

Algo importante de destacar en la prueba de ELISA es que pueden llegar a detectar anticuerpos de una forma más temprana que la misma NPLA, sin que estos sean neutralizantes como lo demostró Colijin et al., 1997 (67). Estos investigadores compararon Ceditest ELISA para PPC E2, encontrando que la concordancia con la NPLA fue del 95%, detectando una diferencia en solo 8 sueros de 152 sueros evaluados, los cuales a los 17 y 21 días post-infección fueron negativos por NPLA, respecto a la ELISA siendo estos positivos. Dos sueros colectados a los 17 d.p.i. (días post-infección) fueron sospechosos por Ceditest ELISA, pero fueron positivos por NPLA. Con respecto a la NPLA, no se encontraron falsos negativos. Por otra parte, 5 sueros pre y 35 post-vacunación a los días 0-196 p.d.v., se encontrando una correlación entre la NPLA y Ceditest ELISA en la detección de anticuerpos, siendo la misma correlación en los sueros evaluados post-infección. Dos sueros del mismo animal tomados a los días 36 y 49 p.d.v. fueron negativos por NPLA y positivos por Ceditest ELISA. Un suero colectado al día 22 d.p.v. fue sospechoso por Ceditest ELISA pero positivo por NPLA. Para este estudio se encontró alta sensibilidad (sensibilidad 99% - especificidad 99%) de la Ceditest ELISA respecto a la NPLA, detectando anticuerpos en todos los cerdos a los 21 días post-infección, mientras que para la NPLA permanecían tres sueros negativos al mismo tiempo (67).

1.6.4 Propagación viral en cultivos celulares (aislamiento viral)

El aislamiento viral se realiza en cultivos celulares primarios de riñón porcino (líneas celulares PK15- SK6) los cuales son permisivos a la infección viral a partir de suspensión de órganos, sangre completa, glóbulos blancos, suero o plasma en animales infectados por PPC. Debido a que el virus no produce efecto citopático sobre las líneas celulares, las células son fijadas y revelada la presencia del virus por prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFA) o por inmunoperoxidasa (NPLA). El aislamiento viral se considera como la herramienta "estándar de oro" en la detección de antígeno e indispensable para la confirmación de un brote por esta enfermedad. Además, los aislamientos virales son importantes para efectuar el análisis de los genotipos circulantes en el campo y el establecimiento de condiciones epidemiológicas (66).

1.6.5 Detección directa del antígeno

Para la detección directa del antígeno se utiliza secciones congeladas de tejidos frescos fijados mediante la utilización de kits IFA (inmunofluorescencia indirecta) en donde se utilizan anticuerpos monoclonales o policlonales. La principal ventaja de esta técnica es que es rápida y sirve como herramienta en casos de investigaciones inmediatas de brotes en campo. La desventaja es que frecuentemente se pueden presentar inmunomarcación inespecífica generando resultados no concluyentes, por otra parte, la lectura y la interpretación de las pruebas requieren de personal bien entrenado. En infecciones experimentales el virus de PPC puede ser detectado 2-15 días post infección en muestras de tonsila por IFA. La probabilidad de detección del virus en tonsila es más alta en aquellos animales con signos clínicos evidentes que en aquellos animales donde no hay signos clínicos (66).

Por otra parte, se han desarrollado kits comerciales de ELISA de captura para la detección de antígeno de PPC los cuales están dirigidos contra la glicoproteína E^{rns}, a partir de muestras de tejidos, sangre, plasma o sueros en casos agudos de la enfermedad.

1.6.6 Detección del ácido nucleico por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La RT-PCR ha sido uno de los métodos más sensibles para la detección del virus de PPC. En comparación con el aislamiento viral, la detección de ácido nucleico se puede efectuar desde muy temprano en la infección y en periodos más largos en aquellos animales que se recuperan. Después de la extracción del ARN a partir de las muestras, el ARN debe ser transcrito a cDNA para ser amplificado por la PCR (RT-PCR). El análisis de la PCR o RT-PCR se efectúa mediante la evaluación en geles de agarosa por electroforesis (PCR convencional) o por técnicas de PCR en tiempo real (RT-qPCR), lo cual permite evidenciar los productos amplificados en simultáneo. Las ventajas de la RT-qPCR es su alta sensibilidad permitiendo incluso la realización de pools de muestras para su análisis. A pesar de las ventajas que presenta la RT-PCR sobre las técnicas convencionales (inmunodetección viral y aislamiento viral), las técnicas de RT-PCR son extremadamente vulnerables a falsos negativos o falsos positivos. Los falsos negativos pueden resultar cuando el ácido nucleico está degradado, o cuando la mezcla de la reacción presenta inhibidores. Por su alta sensibilidad, los falsos positivos resultan de contaminación entre las muestras o cuando los reactivos o equipos están contaminados (66).

1.7 Diagnóstico de peste porcina clásica en Colombia

Hoy en día se cuenta con varias metodologías diagnósticas usadas para la identificación de lesiones compatibles con la enfermedad, pruebas destinadas para la detección de anticuerpos o antígeno y pruebas destinadas para la detección del ácido nucleico del virus (ARN), las cuales únicamente están autorizadas para uso oficial a cargo del LNDV - ICA con sede en Bogotá.

1.7.1 Histopatología

Se fundamenta en la evaluación rutinaria de los tejidos fijados en formalina y secciones histológicas coloreados con Hematoxilina-Eosina. Se realiza la evaluación microscópica de los tejidos por medio de microscopio óptica convencional, en donde se identifican lesiones características propias de la enfermedad en tejido linfoide (tonsila, bazo y ganglio linfático), intestino (íleon), riñón, SNC-encéfalo y pulmón. Estas lesiones

consisten en encefalitis no supurativa, depleción del tejido linfoide, apoptosis o necrosis y presencia de vasculitis y hemorragias en varios tejidos, principalmente (103).

1.7.2 Diagnóstico Serológico

La detección de anticuerpos específicos frente al virus de PPC es de gran utilidad en caso de aparición de la enfermedad con formas subagudas, crónicas o inaparentes causadas por cepas de baja virulencia, en las cuales el cuadro clínico que se presenta en los animales no resulta de fácil identificación, y la detección del antígeno no siempre es fácil. También los métodos serológicos son valiosos cuando existe una baja incidencia de la enfermedad, en animales que hayan estado supuestamente en contacto con cerdos infectados, o después de la depoblación, limpieza y desinfección en explotaciones con poblaciones nuevas que habían sido afectadas por el virus. Estos métodos resultan esenciales si un país quiere ser reconocido internacionalmente como libre de la enfermedad.

Sin embargo, debido a la capacidad inmunosupresora del virus de la PPC la aparición de los anticuerpos en los animales no se presenta hasta por lo menos 3-4 semanas después de la infección, por lo que no se puede establecer una estrategia de erradicación de la PPC en un país exclusivamente con métodos de diagnóstico serológico (94).

En la actualidad como es el caso de Colombia, en aquellos países donde se utiliza cepa China, no existe ninguna técnica de diagnóstico serológico que permita diferenciar anticuerpos vacunales de los producidos por la infección con virus de campo.

1.7.2.1 Técnica de ELISA Ac

Las técnicas de enzimoimmunoensayo ELISA para la detección de anticuerpos de la PPC que se utilizan hoy en día son técnicas rápidas, sensibles, específicas, de fácil ejecución y permite evaluar un gran número de muestras a la vez. Es importante que los sueros positivos y dudosos se confirmen por seroneutralización. Esta técnica es importante, en casos de la aparición de la enfermedad de forma sub-aguda, crónica o inaparente, generadas por cepas de baja virulencia, en las cuales el cuadro clínico que presentan los animales es inespecífico, y la detección del antígeno no siempre es viable.

Los métodos más utilizados son las ELISAs comerciales de bloqueo, competitiva e indirectas, diseñadas y empleadas para detectar anticuerpos frente a todas las cepas del virus de PPC pero a su vez evitar reacciones cruzadas con otros Pestivirus.

Las técnicas de ELISA detectan anticuerpos contra cepas de PPC de alta, moderada y baja virulencia, de forma temprana después de la infección. La detección de anticuerpos contra cepas de baja virulencia, es importante para la investigación de infecciones sub-clínicas de PPC (68).

La técnica está especialmente diseñada para evaluar un gran número de sueros, condiciones requeridas en programas de erradicación de PPC. Por lo general, después de un brote de PPC en poblaciones libres, se realiza una serología en masa de los animales en un anillo periférico para identificar si fueron infectadas otras granjas. Además, esta prueba puede usarse para evaluar el estado inmune de la población de cerdos en países donde se utiliza la vacunación para la erradicación de la PPC (68, 94).

Para la ELISA de bloqueo, el antisuero puede tratarse de un anticuerpo policlonal obtenido por inoculación de conejos o cerdos con cepas de referencia de PPC, como la cepa C lapinizada (cepa utilizada en las vacunas), o bien de anticuerpos monoclonales específicos de un determinante antigénico exclusivo del virus de PPC (generalmente la glicoproteína E2).

1.7.2.2 Técnica de ELISA Ag

ELISA de competición CTB (Complex - Trapping – Blocking): Se trata de una ELISA de captura-competición que emplea dos anticuerpos monoclonales específicos frente a dos epítopes diferentes de la proteína estructural E2. Siendo esta ELISA utilizada para detectar antígeno viral en sangre o tejidos como una prueba de alta especificidad pero de baja sensibilidad y útil en solo casos agudos de la enfermedad (94).

1.7.2.3 Prueba de seroneutralización (neutralización por anticuerpos ligado al anticuerpo - NPLA)

Es la prueba estándar de oro para el diagnóstico de PPC para el caso de las serologías. Esta técnica consiste en valorar la capacidad de los anticuerpos presentes en un suero

para neutralizar la infección del virus " *in vitro* " (94). La prueba se realiza sobre cultivos celulares de la línea PK -15 (ATCC CCL 33) libres de Virus de Diarrea Viral Bovina. Para su realización se precisa de un virus de referencia como es la cepa ALFORT (9) perfectamente valorado, del que se conocen sus diferentes grados de neutralización, de un suero control conocido previamente y de un cultivo celular. Dado que el virus no produce efecto citopático en los cultivos celulares, la posible replicación de virus no neutralizado se detecta por un sistema indicador de marcado inmunológico. Este sistema puede emplear un conjugado de peroxidasa (NPLA). La prueba se puede leer con un microscopio óptico usando bajo aumento, observándose una tinción rojo intensa en el citoplasma de las células. Los resultados se expresan como el inverso de la dilución del suero inicial con la que la mitad de los cultivos celulares inoculados revele un marcado específico. Pueden existir reacciones cruzadas con títulos bajos entre sueros procesados de cerdos infectados con virus de Diarrea Viral Bovina y el virus de PPC empleado en esta técnica (94). Cuando se trate de un animal infectado con virus de DVB el título neutralizante frente a este virus será varias veces superior al obtenido frente al virus de PPC (69).

1.7.3 Aislamiento y cultivo celular

Es la prueba de oro para el diagnóstico de PPC. La línea celular de uso más frecuente en el laboratorio es la línea de riñón de cerdo PK-15. La replicación del virus en las distintas líneas celulares no produce efecto citopático en las células infectadas. Sin embargo se han descrito un reducido número de cepas citopáticas (13).

El objetivo es aislar virus de muestras de campo (tonsila, ganglio linfático, bazo, riñón, intestino, principalmente). Estas muestras son homogenizadas por maceración en un mortero con arena estéril, más medio de crecimiento en suspensión 10% peso/volumen. Después de incubar durante 1 hora a temperatura ambiente, la suspensión es centrifugada por 30 minutos a 3000 rpm y el sobrenadante se inocula en las placas con monocapa preformadas de cultivo celular KP-15. Se adiciona 50 μ l de cada inóculo sin diluir y en dilución 1:5 con medio de crecimiento en placas de 96 o 24 pozos, los cuales contienen 50 μ l de medio de crecimiento y 50 μ l de células en una concentración de 5×10^5 células/ml. Se inoculan 8 pozos con 50 μ l de la cepa de referencia ALFORT como control positivo y 8 pozos con 50 μ l de medio de crecimiento y 50 μ l de células como

control negativo. Las placas se incuban a 37°C en una atmósfera con 5% CO₂ por 3 días. Se realizan observaciones por microscopía óptica a las 24, 48 y 72 horas para evaluar la integridad de la monocapa. Se debe revelar la presencia del virus por medio de la inmunoperoxidasa utilizando un anticuerpo monoclonal marcado con peroxidasa específico para el virus de PPC.

1.7.4 Identificación del antígeno viral en tejidos

Para la identificación del antígeno viral en tejidos se puede utilizar secciones congeladas obtenidas mediante el uso de criostatos de tejidos frescos como los son: tonsila, bazo, ganglios linfáticos, riñón, parte terminal del íleon, los cuales se someten a la realización de inmunofluorescencia directa o inmunoperoxidasa directa. Para tejidos fijados en formol e incluidos en parafina se utiliza la inmunoperoxidasa indirecta (64).

1.7.4.1 Inmunoperoxidasa indirecta o inmunohistoquímica (IHQ)

Se basa en la evaluación de los tejidos fijados en formalina y secciones histológicas coloreadas con hematoxilina de Harris como contraste. Por esta metodología se demuestra la presencia del antígeno viral mediante la utilización de un anticuerpo monoclonal dirigido contra la proteína E2. Se realiza evaluación microscópica de los tejidos por medio de microscopio óptico convencional, en donde se identifica el antígeno inmunomarcado y revelado por la peroxidasa en tejido linfoide (tonsila, ganglios linfáticos, bazo), intestino (íleon- placas de Peyer), riñón, SNC-encéfalo y pulmón. El antígeno viral se detecta principalmente en macrófagos localizados en tejido linfoide (64,95).

1.7.4.2 Inmunofluorescencia directa

La técnica de inmunofluorescencia directa (IFD) se basa en una reacción inmunológica antígeno anticuerpo que puede ser evidenciada por el uso de anticuerpos unidos a radicales orgánicos con propiedades fluorescentes evidenciado en un microscopio de luz ultravioleta. Se fundamenta en la evaluación de los tejidos congelados frescos y cortados con un instrumento de congelación (criostato), el cual permite montar cortes delgados en lámina portaobjetos para la realización de la técnica de inmunofluorescencia directa utilizando un anticuerpo policlonal conjugado con fluoresceína. El tejido más utilizado es tonsila. La interpretación de la prueba en casos positivos se establece por la emisión de fluorescencia al identificarse el antígeno de los diferentes componentes

celulares de los tejidos a evaluar. La fluorescencia en cada sección de tejido se puede medir en forma subjetiva por escala de intensidad en cruces como: No fluorescencia (0+), fluorescencia no específica (0), fluorescencia opaca (1+, dudoso a Pestivirus), fluorescencia débil (2+, positivo a Pestivirus), fluorescencia brillante (3+, positivo a Pestivirus), fluorescencia intensa (4+, positivo a Pestivirus).

La ventaja de esta técnica es que el tejido no requiere procesamiento alguno, solo la congelación. La desventaja respecto a la inmunoperoxidasa, es que al utilizar un anticuerpo policlonal se puede detectar otros Pestivirus, como el Virus de Diarrea Viral Bovina. De igual forma no se puede diferenciar entre el antígeno de campo y el vacunal. Por otra parte la sensibilidad y especificidad es muy baja (menor al 70%) (Greiser I., 2008 comunicación personal sin publicar - consultoría -ICA en PPC año 2008).

1.7.4.3 Inmunoperoxidasa directa

Se utilizan tejidos en congelación y la prueba consiste en una reacción inmunológica antígeno anticuerpo evidenciado por el uso de anticuerpos monoclonales marcados con la enzima peroxidasa de rábano picante –HRPO (64). Se utiliza la técnica estándar reportada por Terpstra (71). Esta técnica se utiliza para detectar el virus de PPC en células infectadas de los diferentes tejidos tomados durante la necropsia de los animales o en cultivos celulares. Se utiliza un anticuerpo monoclonal específico (CEDITEST ID-DLO, Holanda) para virus de PPC el cual está dirigido contra la proteína E2.

La presencia de gránulos pardos rojizos en el citoplasma de las células del tejido a evaluar, indica el reconocimiento del virus, por el respectivo conjugado considerándose una reacción positiva. La ausencia de esta inmunomarcación se considera negativa (76).

1.7.5 RT-PCR convencional

La técnica de PCR por su sensibilidad y rapidez es hoy en día una de las técnicas de elección para el diagnóstico de un gran número de enfermedades.

En el caso de PPC que es un virus cuyo ácido nucleico es ARN, el primer paso consiste en la extracción del ARN a partir de muestras sospechosas. Como lo que se amplifica en la reacción de PCR es el ADN, una vez extraído el ARN debe ser convertido en ADN complementario (cDNA). Esta conversión se hace mediante la utilización de una enzima llamada transcriptasa reversa. Los primers (cebadores) utilizados definen la zona del ácido nucleico que se va amplificar, por lo que en el caso de PPC, se puede optar por amplificar una zona del ARN conservado entre todos los Pestivirus o bien por amplificar una zona específica de los virus de PPC y que no se encuentran en otros Pestivirus, con lo que podremos dar un diagnóstico general de Pestivirus o uno específico de PPC. En la actualidad, se utiliza la amplificación de gen NS5B específica del virus de PPC o un fragmento de la región 5'UTR (72).

1.7.5.1 RT-PCR anidada para E2 y RT- PCR para 5'UTR del virus de PPC

Para el caso de la RT-PCR anidada E2, consiste en dos reacciones de PCR, en la cual se amplifica un segmento determinado del genoma, que se utilizará como molde en la segunda reacción; y dos primer internos en la segunda ronda de PCR, que van a amplificar un segmento interno más pequeño que está dentro del segmento que comprende los primer externos. La segunda amplificación es de menor tamaño que la obtenida en la primera reacción. Este tipo de PCR se utiliza cuando es necesario aumentar la sensibilidad y la especificidad de la reacción, generalmente cuando se dispone de poco ADN diana en la muestra. El aumento de la sensibilidad se debe a que para que la segunda reacción de PCR sea eficiente es necesario que la primera haya tenido éxito.

El virus de PPC presenta un marco abierto de lectura (ORF) que está flanqueado por regiones no codificantes (UTR) en los extremos 5' y 3'. La región genómica más ampliamente estudiada del virus de PPC y en general de los Pestivirus es la región 5'UTR, la cual parece cumplir una función muy importante para la iniciación de una transcripción eficiente. En los últimos años se ha demostrado la gran utilidad del análisis de esta región en los estudios de Epidemiología Molecular (93).

Para el caso del diagnóstico de PPC por RT-qPCR comúnmente en los laboratorios de referencia internacional para la enfermedad, utilizan como región blanco de análisis la región 5'UTR, ya que esta región presenta segmentos altamente conservados para el caso del virus de Peste Porcina Clásica. Para esto se han diseñado primers y sondas (Taq-Man) para esta región blanco, utilizando de igual forma controles internos para las pruebas (78,98,99). Por otra parte se ha encontrado una mayor sensibilidad y para las RT-qPCR diseñadas para el diagnóstico de PPC respecto a el aislamiento viral, demostrando una alta eficacia de esta técnica en la detección de infecciones subagudas y crónicas que pueden pasar desapercibidas en campo.

1.7.5.2 RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR real time)

Esta técnica se basa en la detección y la cuantificación de la fluorescencia. En el ciclo de amplificación en el cual la emisión de la fluorescencia de los productos de la amplificación supera el nivel del umbral (Ct ciclo), es inversamente proporcional al registro inicial del número de blancos secuenciados (73). Para el caso del diagnóstico de PPC se utiliza la amplificación de la región 5'UTR, la cual es altamente conservada en el genoma del virus de PPC (105,106,107,108).

2. Materiales y métodos

2.1 Animales experimentales

Se seleccionaron treinta (30) animales de la raza York/Landrace de una explotación intensiva tecnificada convencional, cuyos criterios de selección fueron: 50 días de edad en promedio, peso aproximado de 15-20 kilos, con una distribución homogénea de sexos. Los cuales estaban en buenas condiciones de salud al momento de la selección y sin presentación de historia de vacunación para PPC.

2.1.1 Virus y cultivo celular

- Se utilizaron dos vacunas comerciales las cuales se denominaron vacuna "A" nombre comercial COLERVEC (cepa China de origen francés) de laboratorio VECOL que contiene 10^4 DI₅₀ virus de PPC producida en cultivo celular, para aplicación de 2 ml por animal vía intramuscular o subcutánea, y la vacuna "B" PEST- VAC (cepa China de origen americano) de laboratorio Pfizer, que contiene $10^{2.5}$ DI₅₀ virus de PPC producida en cultivo celular y en dosis de aplicación de 2 ml por animal vía intramuscular o subcutánea.
- Como antígeno de desafío se utilizó la cepa de campo Santander, cepa utilizada en Colombia para la evaluación de vacunas, siendo esta aislada en brotes de PPC en condiciones naturales en el país, la cual se emplea siempre con un título de 10^5 DIC₅₀ml (P/7 - 1997-2-11).
- En este estudio se incluyó como cepa de referencia Alfort/187, proporcionada por el Institute for Virology Hannover Veterinary School, Hannover, Germany
- Se utilizó además la línea celular PK-15 ATTC Ref. CCL 33 (USA) para realización de la técnica de neutralización viral y aislamiento viral

2.1.2 Reactivos y equipos

- Para las pruebas de ELISAs Ac y Ag para PPC, se utilizaron kits comerciales de las marcas Prionics® e Idexx®. Para la evaluación de Circovirus Porcino y Síndrome Respiratorio Reproductivo Porcino (PRRS), se utilizaron los kits de Synbiotics® e Idexx® (X2) respectivamente.
- En la realización de la inmunohistoquímica se utilizó un anticuerpo monoclonal dirigido contra la glicoproteína E2 suministrado por el Canadian Food Inspection Agency National Centre for Foreign Animal Disease - CFIA y cuyo sistema de revelado utilizado fue de marca DAKO (USA).
- La extracción de ARN viral de PPC se llevó a cabo mediante la utilización de un kit comercial RNeasy 74104 de Qiagen (USA).
- Para la realización de la PCR en tiempo real se utilizó el kit de amplificación One Step RT-PCR Qiagen (USA), la enzima M-MLV (transcriptasa reversa), la Go Taq Flexi (Promega- USA) y un kit de purificación MagMAX-96 Viral Isolation AMB 1836-5 Ambion (USA).
- Como equipos se utilizaron para la realización de las PCRs un termociclador Bio-Rad (USA) para PCR convencional y el Bio-Rad iQ500 (USA) para la realización de PCR en tiempo real.

2.2 Etapas experimentales

Se plantearon tres etapas experimentales, teniendo en cuenta que para la realización del experimento se contemplaron los principios éticos, las buenas prácticas profesionales y de bienestar animal, exigidas por la Universidad Nacional de Colombia y el Consejo Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnistas de Colombia.

2.2.1 Primera etapa

Los animales experimentales fueron traídos de la granja y confinados en unidades de aislamiento en el Laboratorio Nacional de Insumos Pecuarios - LANIP- ICA. Al segundo

día de llegada se tomaron, 7 ml de sangre en total en tubos sin anticoagulante y 7 ml de sangre en tubos con EDTA, a cada uno de los animales. Estas muestras fueron evaluadas por ELISA-Ac, ELISA- Ag, RT-PCR, y RT-qPCR, para determinar la ausencia de anticuerpos a PPC, la ausencia de antígeno viral y ácido nucleico del virus de PPC. Esto se realizó 2 días previos al inicio del experimento (Tabla 1).

Igualmente, se determinó el estado sanitario de los animales mediante una evaluación clínica y serológica por las técnicas de ELISA comerciales para las siguientes enfermedades: Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS) (ELISA - Idexx®) y Circovirus Porcino (ELISA- SYNBIOTICS®), encontrándose que los animales eran negativos para PRRS, pero positivos a Circovirus Porcino en su totalidad.

Para este experimento se conformaron tres grupos de animales los cuales se distribuyeron homogéneamente por sexos y se identificaron cada uno de los animales adecuadamente, constituyéndose los grupos de la siguiente manera:

- Grupo A de 12 animales - Se vacunó con la Vacuna A - 1 en la etapa dos
- Grupo B de 12 animales - Se vacunó con la Vacuna B - 2 en la etapa dos
- Grupo C control de 6 animales (desafiados con la cepa Santander)

Para la realización de las pruebas de laboratorio (RT-PCR, RT-qPCR, ELISA Ac y Ag, inmunoperoxidasa e histopatología) se tuvo en cuenta las metodologías de rutina y documentadas en los manuales de procedimientos estandarizados establecidos en el Laboratorio Nacional de Diagnóstico Veterinario (LNDV) del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) y de referencia para el diagnóstico de PPC en la Unión Europea y para la OIE (64,89).

2.2.1.1 Análisis bioinformático de las cepas virales utilizados

Se realizó el análisis filogenético de las cepas vacunales y de la cepa de desafío usando el programa Mega 5 (USA) y la información disponible en el GenBank® y estudios filogenéticos previos de cepas colombianas evaluando una parte del segmento E2 según la clasificación de Paton et al., (2000) (80, 96).

2.2.2 Segunda etapa

Se realizó la vacunación de cada uno de los grupos (A y B) para posteriormente evaluar la respuesta postvacunal, el establecimiento de la viremia, distribución antigénica y respuesta serológica a la vacunación por un periodo de 15 días antes del desafío a excepción del grupo control (Tabla 1).

- Grupo A, de 12 animales se aplicó por vía parenteral en la tabla del cuello en una sola dosis de 2 ml y según las recomendaciones del fabricante, la vacuna denominada vacuna "A".
- Grupo B, de 12 animales se aplicó por vía parenteral en la tabla del cuello en una sola dosis de 2 ml según las recomendaciones del fabricante, la vacuna denominada vacuna "B".
- Grupo C, de 6 animales denominado grupo control no se le aplicó ningún tipo de biológico, si no el diluyente (agua destilada) con el que se reconstituyen cada una de las vacunas al momento de la vacunación de los otros grupos.

2.2.3 Tercera etapa

Para evaluar el efecto protector de las vacunas, la viremia, distribución antigénica y respuesta serológica a la cepa de desafío, todos los grupos fueron sometidos a la aplicación de 1 ml en la tabla del cuello con la cepa Santander al día 16 del experimento. Para esto se reconstituyó la cepa de desafío en 5 ml de MEM 199 (GIBCO®-USA), para luego hacer una dilución 1:10 en MEM 199 y posterior una dilución 1:30 en MEM 199. Se asumió que con esta dilución se alcanzaría la DE 50%, y de esta forma los cerdos se estarían enfermando 5-6 días post-infección (d.p.i.). Por otra parte, deberían morir entre el 8-11 d.p.i., según las pruebas estandarizadas con la cepa de desafío en el pasado (Tabla 1).

2.3 Recolección de muestras

Se efectuó la colección de muestras como se muestra en la Tabla 1, posterior a la aplicación de cada uno de los tratamientos (vacunación o desafío) para la realización del recuento leucocitario, ELISA-Ac, ELISA-Ag, inmunohistoquímica (IHQ), RT-PCR anidada E2 y RT-qPCR 5'UTR de muestras según correspondió (suero, células blancas y tejidos) de los 30 animales, en intervalos de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16 días posteriormente a cada uno los tratamientos (vacunación o desafío). Con estos procedimientos se determinó, la dinámica de la carga viral vacunal, la distribución antigénica y la seroconversión en el transcurso de 30 días. De igual forma se evaluó por RT-PCR anidada E2 y RT-qPCR 5'UTR, la posible eliminación del virus vacunal o de desafío, mediante la toma de hisopados nasales y rectales, con el mismo esquema de muestreo.

De los dos grupos de animales vacunados en la segunda etapa se sacrificaron 5 animales de cada grupo, seleccionados aleatoriamente al día 6, 8, 10, 12, 15, para establecer la presencia de posibles lesiones histopatológicas y la distribución del antígeno vacunal de las dos vacunas comerciales utilizadas en los siguientes tejidos: membrana nictitante, tonsila, ganglios linfáticos (submandibulares, bronquiales, inguinales superficiales y mesentéricos), bazo, intestino (íleon), encéfalo, pulmón y riñón. Esto se llevó a cabo por medio de RT-PCR anidada E2, e inmunohistoquímica (IHQ). Por otra parte, se evaluaron la tonsila y pool de bazo y ganglios linfáticos (submandibulares, bronquiales, inguinales superficiales y mesentéricos) por RT-PCR anidada E2 y RT-qPCR 5'UTR para establecer la posible detección del ácido nucleico del virus vacunal (77,78).

Para las muestras colectadas en la tercera etapa se realizó el mismo procedimiento de muestreo y evaluación aplicado en la segunda etapa para determinar la carga viral, la aparición de anticuerpos, la posible eliminación y distribución de antígeno de desafío en 5 animales sacrificados de cada grupo a los días 20, 22, 24, 26, 29, 30. Los animales que fallecieron y/o sacrificaron durante el reto, se les realizó la necropsia y la toma de muestras de tejidos, para evaluación histopatológica, inmunohistoquímica (IHQ) y RT-PCR anidada E2 y RT-qPCR 5'UTR.

De las muestras tomadas antes y después del desafío se seleccionaron 22 animales para la realización de aislamiento viral (vacunal y/o desafío) a partir de pools de tejido linfoide (tonsila, bazo y ganglios linfáticos submandibulares, bronquiales, inguinales y mesentéricos) por tres pasajes en cultivos PK-15 con la siguiente distribución: 8 cerdos del grupo A, 8 cerdos del grupo B y los 6 cerdos del grupo control.

Las muestras tomadas (sueros, leucocitos y tejidos frescos) para los diferentes análisis realizados se conservaron a -70°C hasta su procesamiento, de igual forma las muestras tomadas para diagnóstico histopatológico se conservaron en formalina tamponada al 10%, hasta la realización de cortes para inclusión en parafina, coloración (H-E) y evaluación histopatológica y realización de la inmunohistoquímica (IHQ) (74,95).

Tabla 1. Diseño del ensayo

Resumen Experimental			
Diseño Experimental	No. de Animales	Colección de Muestras	Prueba
<u>Primera Etapa</u> Muestreo 2 día previo al experimento	30 cerdos 15-20 kilos Distribución homogénea por sexos	Suero y leucocitos	Pruebas de ELISA para PRRS y Circovirus Porcino SN(NPLA) y RT-PCR para PPC Evaluación clínica
Formación de Grupos para experimentación	30 cerdos Grupo A (12 Vacuna A) Grupo B (12 Vacuna B) Grupo C (6 Controles)	No se colectaron muestras	Evaluación clínica
<u>Segunda Etapa</u> Muestreo 1 día *Tto 2 día 4 día 6 día 8 día 10 día 12 día 15 día	Aplicación de la vacunación 30 cerdos Grupo A (12 Vacuna A) Grupo B (12 Vacuna B) Grupo C (6 Controles)	Se colectaron muestras después de la vacuna de: Suero y leucocitos Hisopados nasales y rectales. Tejidos frescos y en formol (membrana nictitante, tonsila, GL(sub-mandibulares, bronquiales, inguinales superficiales y mesentéricos), bazo, ilion, encéfalo, pulmón y riñón).	ELISA Ac- Ag NPLA Recuento leucocitario RT-PCR anidada E2 RT-qPCR 5'UTR IHQ - Histopatología Aislamiento viral Evaluación clínica
<u>Tercera Etapa</u> Muestreo 16 día * Tto 18 día 20 día 22 día 24 día 26 día 29 día 30 día - FIN del Experimento	Desafío con cepa Santander 20 cerdos 7 Vacuna A 7 Vacuna B 6 Controles	Se colectaron muestras después del desafío de: Suero y leucocitos Hisopados nasales y rectales. Tejidos frescos y en formol (membrana nictitante, tonsila, GL (sub-mandibulares, bronquiales, inguinales superficiales y mesentéricos), bazo, íleon, encéfalo, pulmón y riñón).	ELISA Ac- Ag NPLA Recuento leucocitario RT-PCR anidada RT-qPCR 5'UTR IHQ – Histopatología Aislamiento viral Evaluación clínica

Tabla 2. Momento del sacrificio de los animales por cada grupo experimental

Animal	Grupo	Día del sacrificio o muerte
2	A	6 día
9	B	6 día
3	C	6 día
3	A	8 día
1	B	8 día
1	A	10 día
10	B	10 día
8	A	12 día
4	B	12 día
6	A	15 día
5	B	15 día
5	A	20 día
6	B	20 día
7	A	22 día
11	B	22 día
12	A	24 día
12	B	24 día
9	A	26 día
8	B	26 día
6	C	27 día
2	C	29 día
10	A	29 día
7	B	29 día
4	A	30 día
11	A	30 día
2	B	30 día
3	B	30 día
4	C	30 día
1	C	30 día
5	C	30 día

2.3.1 Evaluación clínica mediante valoración de la temperatura de los animales

Para este estudio, se realizó el registro de la toma de temperatura rectal diariamente en las primeras horas de la mañana a todos los animales en los tres grupos experimentales, tendiente a establecer cambios significativos en los rangos de temperatura

relacionándolos con un posible efecto de la vacuna o del virus de campo una vez desafiados los animales.

2.3.2 Evaluación clínica de los animales al momento del sacrificio

Se realizó la valoración clínica e identificación de lesiones macroscópicas de los animales que se sacrificaron después de la vacunación y posterior al reto. El propósito fue caracterizar los cuadros clínicos y las lesiones macroscópicas antes y después de la necropsia de cada animal mediante un protocolo de valoración clínica y hallazgos macroscópicos, que permitió establecer efectos de las vacunas o del virus de desafío en los tres grupos de animales.

2.4 Procesamiento de las muestras

Todas las muestras tomadas en las diferentes etapas del experimento fueron sometidas a sus análisis respectivos (recuento leucocitario, detección de anticuerpos o antígeno y detección del ácido nucleico viral-ARN) para el establecimiento de la respuesta inmune y el establecimiento de la dinámica viral.

2.4.1 Recolección y recuento leucocitario

Las muestras de sangre se tomaron en tubos vacutainer con EDTA de 5 ml cada uno (Becton Dickinson-USA). Para la realización de pruebas de PCR se realizó la separación de los glóbulos blancos utilizando HISTOPAQUE-1077 (SIGMA- USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante, siendo estos conservados a -70°C hasta su procesamiento. Por otra parte, a estas muestras de sangre tomadas en los diferentes días de muestreo, se les realizó recuento celular mediante la utilización de la cámara de Neubauer 1/10mm (Boeco - Alemania).

2.4.2 Procesamiento de las muestras para diagnóstico histopatológico

Las muestras colectadas durante la necropsia se fijaron en formalina tamponada al 10% se procesaron en secciones histológicas coloreadas con Hematoxilina-Eosina (H-E), según el método estandarizado en el laboratorio (74). Para posterior evaluación de los

tejidos por microscopía óptica convencional y toma de las respectivas microfotografías de tejidos con lesiones significativas.

2.4.3 Detección del antígeno de PPC

Para detectar el antígeno viral en las muestras tomadas durante todas las etapas experimentales se utilizaron diferentes metodologías como la inmunohistoquímica (IHQ) para la detección de Ag, la cual fue utilizada para evaluar cortes histológicos, ELISA-Ag para la evaluación de sueros y el aislamiento viral, para el cual se utilizaron pools de tejidos linfoides por cada animal (tonsila, bazo y ganglios linfáticos).

2.4.3.1 Identificación del antígeno viral de Peste Porcina Clásica por inmunohistoquímica (IHQ)

Para el establecimiento de la presencia y la distribución del antígeno de Peste Porcina Clásica de tipo vacunal o de desafío, se realizó la identificación de los mismos mediante la utilización de un anticuerpo monoclonal producido en conejo (HCV Mc AB WH303-4 - Glicol- Canadian Food Inspection Agency National Centre for Foreign Animal Disease - CFIA) dirigido contra la glicoproteína E2 y cuya técnica se estandarizó en LNDV-ICA usando como base el protocolo de referencia del - CFIA. Para esto se utilizó el anticuerpo monoclonal en una dilución de 1:200, sobre los cortes de tejidos similares a los utilizados en la evaluación histológica en cada animal en los diferentes grupos.

La identificación del antígeno por medio de inmunohistoquímica se caracterizó por la presentación de una coloración parda o rojiza intensa al interior del citoplasma de las células de la línea linfóide o mielóide, o en células de diferentes tipos en donde se localizó el antígeno en los diferentes tejidos evaluados y que posiblemente son sitios de replicación viral de predilección (95).

Se categorizó la presencia del antígeno dependiendo el grado de inmunomarcación en los diferentes tejidos según criterios subjetivos así (95):

- Sin inmunomarcación: no hay marcación de la muestra analizada – Negativo a Peste Porcina Clásica
- Inmunomarcación escasa: hay marcación de un bajo número de células (5-20) por campo de 100X – Positivo a Peste Porcina Clásica

- Inmunomarcación moderada: ocurre marcación de un moderado número de células (20-50) por campo de 100X – Positivo a Peste Porcina Clásica
- Inmunomarcación marcada: detección de la marcación en la mayoría del componente celular del tejido por campo de 100X – Positivo a Peste Porcina Clásica

Las muestras de tejido incluyeron: tonsila, membrana nictitante, bazo, ganglios linfáticos (sub-mandibulares y mesentéricos), pulmón, parte terminal de íleon y riñón.

Brevemente, la técnica de inmunohistoquímica consistió inicialmente en el tratamiento de láminas con polilisina, para luego aplicar los cortes histológicos y posteriormente tratamiento de los cortes, lo cual continuó con una remoción de la parafina en estufa a 60°C toda la noche, para luego retirar el restante de parafina de los cortes a través de 3 pasos por xilol (3 minutos c/u), seguido de la rehidratación de los tejidos en alcoholes descendentes 100%, 95%, 70%, 50%, para luego realizar el lavado con agua destilada, (3 minutos c/u), seguido de un lavado con TBS-Tween por 2 minutos. Posterior a esto, se llevó a cabo el bloqueo endógeno de la peroxidasa con H₂O₂ al 3% por 10 min., seguido del lavado de las láminas por tres veces con TBS-Tween, para luego exponer el antígeno por medio de la digestión con proteinasa K al 0.001% (diluida en TBS-Tween) por 2 minutos a temperatura ambiente.

A continuación, se lavaron en TBS-Tween por 2 minutos y se aplicó 200 ul (3-4 gotas) por lámina sobre el tejido del anticuerpo monoclonal (HCV Mc-Ab WH 303-4 172) dirigido contra la proteína gpE2 de PPC, en una preparación de 1:200 dejándolas incubar por una hora en cámara húmeda. Posteriormente se utilizó el sistema de revelado de DAKO (USA) de la siguiente forma; se aplicó el anticuerpo secundario 200 ul (3-4 gotas) (DAKO LSAB 2, LINK - IgG anti-conejo de Cabra- marcado con biotina-USA) y se incubó por 10 minutos, para luego lavar con TBS-Tween por 2 minutos, aplicando más tarde el conjugado (streptavidin – HRP) 200 ul (3-4 gotas) (DAKO LSAB 2, LABEL-USA) dejando incubar por 10 minutos, para luego lavar con TBS-Tween por 2 minutos y enseguida de esto aplicar el sustrato cromógeno DAKO AEC (3 amino-9 etilcarbazole) 200 ml (3-4 gotas) por 5 minutos. Finalmente, se lavó y se contrastó con Hematoxilina de Meyer por 5 minutos, para luego lavar con agua corriente hasta retirar el exceso de colorante y hacer un paso por agua amoniacal (5-10 segundos) y finalmente se lavó para realizar el montaje en medio acuoso (técnica estandarizada y modificada sin publicación

por Piñeros R. - LNDV-ICA, tomando como base el protocolo del Canadian Food Inspection Agency- CFIA) (Anexo B).

En la interpretación, las células marcadas con el anti-PPC gpE2, se tuvo en cuenta un patrón de tinción en el citoplasma y núcleo celular de color pardo rojizo. Se utilizó como control positivo casos de campo positivos a PPC (64,75,76,95).

2.4.3.2 Procesamiento de las muestras de suero por ELISA- Ag (detección de antígeno de PPC)

Se utilizaron dos kits comerciales para la identificación de antígeno del virus de PPC (Prionics® e Idexx® respectivamente), según los procedimientos descritos por el fabricante y los cuales se utilizan rutinariamente en el LNDV-ICA para diagnóstico. Estos fueron empleados para analizar las muestras de sueros tomadas durante toda la etapa experimental previamente descrita con el objeto de detectar el antígeno viral relacionado con el virus vacunal o de desafío.

2.4.3.3 Aislamiento viral

Dado que el crecimiento del virus no produce efecto citopático, su presencia se debe poner de manifiesto mediante un método de marcado inmunológico. Para ello, las células se fijan a las 24-72 horas, y el antígeno del virus se detecta mediante la utilización de un suero anti-VPPC conjugado con peroxidasa. En caso negativo se efectúan pases ciegos hasta un mínimo de dos veces (hasta tres pasajes). Es una técnica muy sensible, ya que aunque exista una pequeña cantidad de partículas virales infecciosas viables se podrá multiplicarse en la línea celular haciéndose más evidente su detección y confirmación de casos positivos a PPC no obstante es muy lenta y laboriosa (89,94). Para la realización del aislamiento viral se realizó el siguiente procedimiento. 1) **Preparación del inóculo** a partir de suspensión tisular de cortes en fragmentos pequeños 1-2 g de tejido (pool de tonsila, bazo y ganglios linfáticos) y macerados, para posteriormente hacer una suspensión al 10% (p/v) homogenizando del tejido en 9 ml de medio DMEM-Dulbecco's (GIBCO®-USA). Se suplementó con 1% antibiótico + 1% de fungizona hasta formar una suspensión homogénea. La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 hora, para luego centrifugar a 3000 r.p.m. durante 15 minutos. El sobrenadante se usó para la inoculación de los cultivos celulares previo

filtrado mediante la utilización de filtros de 0.45 µm. 2) **Inoculación de células PK-15**, se tomaron células PK-15 con 24 horas de crecimiento, se lavaron 3 veces con PBS y se agregó tripsina, se homogenizaron y luego se llevó el cultivo a una incubadora a 37°C hasta su desprendimiento. Luego se resuspendieron las células con medio MEM-Dulbecco's (GIBCO®-USA) suplementado con SFB al 5%, 1% de piruvato, 1% de glutamina y 1% de Pest (Penicilina-estreptomicina), para luego tomar placas de 24 pozos agregándoles 1 ml de la suspensión celular a cada pozo, seguido de la incubación por 24 horas a 37°C con 5% de CO₂. Posteriormente, se descartó el medio y luego se agregó 200 µl de la suspensión tisular, en cada pozo de la placa con células PK-15. Las muestras se inocularon por triplicado, acompañadas de controles positivos y negativos. Como control positivo, se utilizó la cepa de referencia Alfort/187 de PPC. De la misma manera se realizó en pareado otra placa de 24 pozos, las cuales se utilizaron para el revelado o inmunomarcaje de cada pase. Seguido de lo anterior, los cultivos celulares se llevaron a incubación a 37°C por 1 hora con 5% de CO₂, para luego realizarse lavados con PBS y adicionar medio fresco de mantenimiento para llevarse nuevamente a incubación de 48-72 horas, en las mismas condiciones descritas. Se tomó una placa y se llevó a congelación a -70°C para luego descongelar realizando esto dos veces, lisando las células para efectuar el siguiente pase celular. Las células de la otra placa (preparación por duplicado) se lavaron con PBS, fijadas al calor a 70-80°C durante 2 horas, y se revelaron cómo se describirá a continuación en la NPLA, considerándose positivo el aislamiento viral a la inmunomarcación pardo rojizo en el citoplasma de las células que conforman la monocapa en el cultivo celular (Anexo E) (89).

2.4.4 Detección de anticuerpos frente a PPC

Se pretendió detectar la aparición de anticuerpos totales y neutralizantes durante las diferentes etapas experimentales y para esto se tomaron muestras de sueros en diferentes periodos, las cuales se sometieron a las pruebas de ELISA-Ac y NPLA respectivamente.

2.4.4.1 Procesamiento de las muestras de suero por ELISA- Ac (anticuerpos)

Se utilizaron dos kits comerciales para la identificación de anticuerpos: Prionics® (PrioCHECK - CSFV Ab) e Idexx® (HerdChek - Classical Swine Fever Virus/Ab), y se siguieron los procedimientos descritos por los fabricantes, los cuales fueron utilizados para analizar las muestras de sueros tomadas durante toda la etapa experimental mencionada anteriormente.

2.4.4.2 Procesamiento de las muestras de suero por seroneutralización (NPLA)

Se utilizaron monocapas de cultivos celulares preformadas en placas de 96 pozos con 72 horas y con un mínimo de 90% de confluencia, utilizando la línea celular PK-15 (ATCC Ref. CCL-33-USA). 1) Se tomaron las diferentes muestras de sueros obtenidos en cada etapa en los días en que no se detectaba anticuerpos por ELISA o en aquellos en los cuales se obtuvieron resultados sospechosos por esta metodología, antes de la vacunación y días posteriores a esto, los cuales se inactivaron a 56°C con sueros controles positivos y negativos de referencia, por 30 minutos a baño maría para inactivar el complemento. 2) Luego se prepararon las diluciones de los sueros 1:25 y 1:50 en tubos de 0.5 y 1 ml en medio DMEM Dulbecco's (GIBCO®-USA) más solución de antibióticos 3) Posteriormente se descongeló una alícuota de virus de referencia Alfort/187 previamente titulado y conservado a -70°C. Se preparó en medio DMEM-Dulbecco (GIBCO®-USA) la dilución viral correspondiente a las 100 DICT₅₀ a partir del virus con un título viral de 10^{5.9} DICT₅₀. 4) A continuación, se realizó el mismo procedimiento utilizado en el aislamiento para el tratamiento de las células y disposición en los pozos y conformación de cultivos celulares de 24 horas con una confluencia del 90-95%. 5) Para efectuar la neutralización se tomó 50 µl de sueros a investigar en diluciones 1:25 y 1:50 en cada pozo por duplicado. De igual forma, se incluyeron sueros controles positivos negativos y control de células. 6) Mas tarde se adicionó 50 µl de la dilución viral correspondiente a las 100 DICT₅₀ a todos los pozos dejando libre los controles de células. 7) Luego se incubó la placa de mezcla suero-virus a 37°C en 5% CO₂ por 60 minutos. 8) y se procedió a sacar las placas y se adicionó 50 µl de la suspensión celular en una concentración de 500.000 células/ml en todos los pozos. 9) Posteriormente, se incubó a 37°C con 5% CO₂ por 48 horas. 9) luego se lavaron dos

veces con 200 µl de PBS diluido en 1:2 en agua desmineralizada y se secaron durante dos horas a 40°C. 10) Seguidamente se procedió a revelar las placas realizando la inmunoperoxidasa, para lo cual se preparó el conjugado anti VPPC/proteína A peroxidasa el cual se dispensó 50 µl en cada pozo. Luego de esto, se incubó una hora a 37°C en cámara húmeda y pasado este tiempo se lavó con PBS-Tween. 11) Se preparó la solución ABC la cual se adicionó 50 µl en cada pozo para una posterior incubación por 15-30 minutos, hasta que se observó color pardo en los pozos control con las 100 dosis virales. 12) Se agregó 200 µl de PBS diluido a todos los pozos para la realización de la lectura con el microscopio de luz invertido (64,75,76,89).

2.4.5 Detección de ácido nucleico del virus de PPC por RT-PCR y RT-qPCR

Con el propósito de detectar la presencia del ácido nucleico del virus de PPC en las diferentes muestras tomadas en las diferentes etapas experimentales se utilizaron dos pruebas PCR: una RT-PCR anidada para la detección de la región E2 y una RT-qPCR para la detección de la región 5'UTR.

2.4.5.1 RT-PCR anidada E2 para la detección del ácido nucleico viral en sueros, leucocitos, tejidos e hisopados nasales y rectales.

La prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) fue diseñada para la amplificación del gen de la proteína E2 del virus de PPC y es empleada para el diagnóstico rutinario (77,89). 1) Inicialmente se realizó la extracción del ácido nucleico de las muestras mediante la utilización de kit comercial de extracción (Qiagen-USA), a partir, sueros, leucocitos, tonsila, ganglios linfáticos en forma individual, pulmón, hígado, bazo e íleon. 2) Se prepararon las mezclas maestras para PCR siguiendo el procedimiento descrito en el instructivo de preparación de mezclas maestras (Anexo C). 3) Mas tarde, se procedió a realizar la PCR1 y PCR2 para la detección del ácido nucleico del virus de PPC, incluyendo los controles de extracción positivo y negativo y las muestras a analizar. 4) Se realizó el montaje en geles de agarosa para su posterior electroforesis, fotodocumentación y comparación de las muestras respecto a los controles y al marcador de peso molecular (76,77) (Anexo C).

De igual forma se buscó realizar la detección del antígeno vacunal y de campo mediante la realización de **pooles de sueros** para lo cual se tomó 100 µl por día de muestreo realizando extracción de ácido nucleico a 150 µl del volumen total del pool para establecer la viremia vacunal o asociada al virus de desafío y posible excreción viral de antígeno vacunal, como de desafío mediante la evaluación de **pooles de hisopos** nasales y rectales tomando 150 µl para extracción y similar a lo descrito para los sueros. Estos hisopos fueron tomados en cada uno de los días de muestreo como se describió.

2.4.5.2 RT-qPCR 5'UTR para la detección del antígeno en sueros, leucocitos, tejidos e hisopados nasales y rectales.

Se utilizó RT - PCR en Tiempo Real (RT-qPCR) la cual es una modificación del RT-PCR convencional. En esta técnica se empleó una pareja de primers y una sonda marcada en el extremo 5' por un fluoróforo (usualmente FAM) y en el extremo 3' por una molécula quencher (usualmente BHQ-1). La sonda se diseñó de manera que se anillara dentro de la región flanqueada por los primers. Se utilizó la RT-qPCR 5'UTR referenciada en la literatura (78) y la cual fue previamente estandarizada en el laboratorio (Anexo D). Las mismas extracciones preparadas para la realización de la PCR convencional anidada E2 fueron utilizadas para la realización de la RT-qPCR 5'UTR, (extracciones de sueros, leucocitos, tonsilas, pool de tejidos linfoides y pool de hisopados nasales y rectales).

2.4.5.3 Curva estándar de cuantificación por RT-qPCR 5'UTR

Con el objetivo de cuantificar la carga viral se realizó una curva estándar siguiendo métodos previamente descritos a partir de la extracción por RNeasy Minikit Cat. No. 74106 QIAGEN (USA) y purificación por QIAquick PCR Purification kit Cat. No. 28106 (USA) de la cepa de referencia Alfort/187 a partir del virus con un título viral de $10^{5.9}$ DICT₅₀, y cuya concentración fue de 33.64ng/µl, realizada esta cuantificación en el Thermo Scientific Nano Drop 1000 (USA) (78,97,98,99).

2.5 Análisis estadístico

Los datos obtenidos en los ensayos fueron analizados para los tres grupos en conjunto con las siguientes pruebas estadísticas:

- Valoración de la temperatura y recuento leucocitario se aplicó el modelo estadístico paramétrico ANOVA (100, 101).
- Valoración subjetiva de hallazgos clínicos de animales al sacrificado y la valoración de las lesiones macroscópicas y microscópicas, los datos fueron evaluados por el modelo estadístico de frecuencia (101,101).
- Para la comparación entre los grupos de las pruebas de ELISA para la detección de anticuerpos frente a PPC se utilizó el modelo estadístico no paramétrico - Kruskal-Wallis (100,101).

Debido a que se presentaron condiciones particulares (bajo número de datos, entre otras) en la colección de datos durante las diferentes etapas experimentales, en donde no se generó suficiente información que se facilitara para el tratamiento y análisis estadístico, solamente se realizó la descripción de la misma. Estos casos fueron: la detección del antígeno de PPC por inmunohistoquímica, la detección de antígeno mediante la utilización de los dos kits de ELISA-Ag, la detección del ácido nucleico del virus de PPC por RT-PCR anidada E2 y la RT-qPCR 5'UTR de muestras de sueros, tejidos o hisopados nasales y rectales y el aislamiento viral, procedimientos realizados en los tres grupos experimentales.

3. Resultados

3.1 Análisis bioinformático de las Cepas Vacunales, Cepa Alfort y Cepa Santander

Se realizó el análisis bioinformático a partir de productos de secuenciación de un segmento de la región E2 de acuerdo con la clasificación de Paton D. et al., (2000) y a partir de secuencias reportas por Sabogal Z. et al., (2006), mediante la utilización del programa Mega 5.0 (USA) haciendo el agrupamiento por subtipos virales de cada una de las cepas utilizadas en el experimento, evidenciándose en este análisis que las cepas vacunales se agruparon en el grupo 1.1 al igual que la cepa de referencia Alfort/187 y la cepa Santander (77,80). Por otra parte, se realizó la matriz de distancia para establecer la identidad entre las cepas utilizadas en el experimento (Figura 2.) (Tabla 3.). Es de anotar que la cepa de la vacuna "A" es una cepa de origen Francés y la cepa de la vacuna "B" es de origen norteamericano.

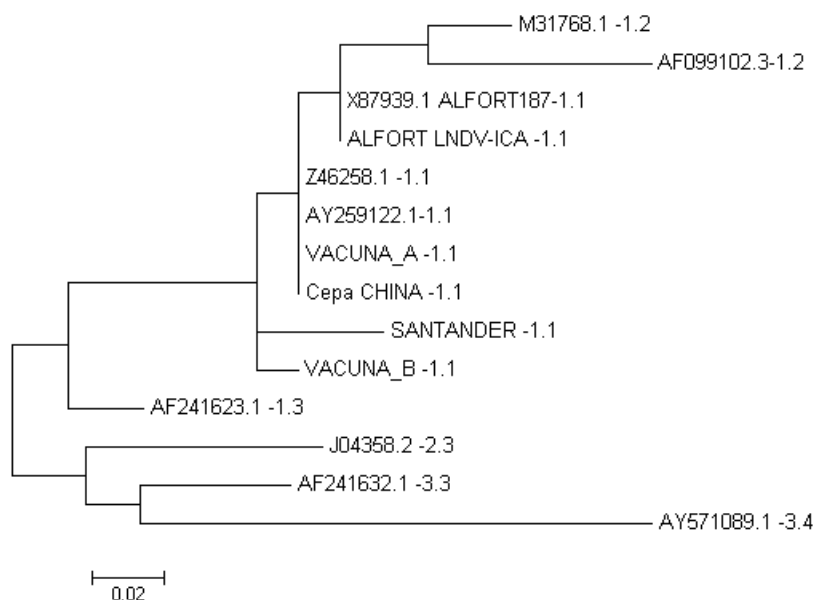


Figura 2. Árbol filogenético para analizar la relación de las cepas virales, cepas de referencia y cepa de campo utilizadas en la comparación entre genotipos y subgenotipos del virus de PPC encontradas en GenBank.

Tabla 3. Matriz de distancia para las cepas analizadas de los grupos 1.1-1.2-1.3-2.3-3.3 y 3.4 respecto a las vacunas, la cepa de referencia y de campo utilizada

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1. Z46258.1 -1.1														
2. AY259122.1-1.1	0.000													
3. ALFORT LNDV/ICA -1.1	0.006	0.006												
4. SANTANDER -1.1	0.026	0.026	0.019											
5. VACUNA_B -1.1	0.013	0.013	0.019	0.026										
6. VACUNA_A -1.1	0.000	0.000	0.006	0.026	0.013									
7. Cepa CHINA -1.1	0.000	0.000	0.006	0.026	0.013	0.000								
8. AF099102.3-1.2	0.056	0.056	0.049	0.073	0.072	0.056	0.056							
9. M31768.1 -1.2	0.033	0.033	0.026	0.048	0.048	0.033	0.033	0.048						
10. AF241623.1 -1.3	0.047	0.047	0.055	0.063	0.048	0.047	0.047	0.098	0.071					
11. J04358.2 -2.3	0.080	0.080	0.088	0.097	0.080	0.080	0.080	0.118	0.089	0.072				
12. X87939.1 ALFORT187-1.1	0.006	0.006	0.000	0.019	0.019	0.006	0.006	0.049	0.026	0.055	0.088			
13. AF241632.1 -3.3	0.080	0.080	0.089	0.098	0.081	0.080	0.080	0.109	0.089	0.056	0.073	0.089		
14. AY571089.1 -3.4	0.130	0.130	0.140	0.152	0.131	0.130	0.130	0.195	0.143	0.131	0.134	0.140	0.109	

3.2 Observación clínica

Los animales experimentales no presentaron anticuerpos frente a virus de PRRS por la prueba de ELISA, pero si evidenciaron anticuerpos en su totalidad a Circovirus Porcino - PCV2, lo cual sugirió exposición al virus de campo. En general los animales presentaron buenas condiciones de salud antes de la realización de la primera y segunda etapa experimental (conformación de los grupos y vacunación).

3.3 Valoración clínica al momento del sacrificio

En la evaluación de los animales durante el periodo de tiempo de 30 días de experimentación se tuvo en cuenta la valoración de la condición clínica al momento del sacrificio (signos y síntomas), tendiente esto a establecer efectos del antígeno vacunal y la condición clínica asociada a el desafío viral con el antígeno de campo (cepa Santander) en los diferentes periodos de tiempo.

3.3.1 Valoración de la temperatura

En el presente estudio como indicador de sintomatología clínica asociada a la presentación y respuesta al antígeno vacunal o de campo de PPC se evaluó diariamente la temperatura de los animales tratando de establecer cambios en los rangos normales

de temperatura ($37,5C^{\circ}$ - $39,5C^{\circ}$ - promedio $39.3C^{\circ}$), puesto que este es un indicador de condición clínica de respuesta a la vacuna o de enfermedad en los animales tanto vacunados como no vacunados. Se encontraron diferencias significativas entre los grupos ($p \leq 0.05$) en los diferentes periodos de tiempo después del desafío, pero es de anotar que como tal hay diferencias en temperaturas sin que esta fluctúe fuera de los rangos normales de temperatura para el caso los grupos A y B (Figura 3) (Anexo F).

Se debe notar que los animales identificados como 1A, 4A, 7A y 7B presentaron incrementos en temperatura, pero se podría considerar este incremento como hipertermia más no fiebre, ya que las diferencias no fueron significativas y no presentaron un cuadro clínico que se pudiera definir como fiebre. Para el caso de los animales 5A y 10A los cuales presentaron incrementos en la temperatura (fiebre) posiblemente asociada a la presentación de neumonía, puesto que al momento del sacrificio presentaron tos y problemas respiratorios.

En el caso del grupo "C" los cuales fueron los animales desafiados se encontraron picos de temperatura altas después del reto (Figura 3) y al final del periodo de vida de cada uno de los animales en donde se encontraron descensos en la misma, posiblemente relacionado a la condición clínica de los animales cercanos a la muerte, la cual cursa con hipotermia. Este hallazgo se encontró de forma relevante para los animales 4C y 6C, los cuales presentaron la condición clínica típica de un cuadro infeccioso por PPC, debido a que eran animales desafiados no vacunados.

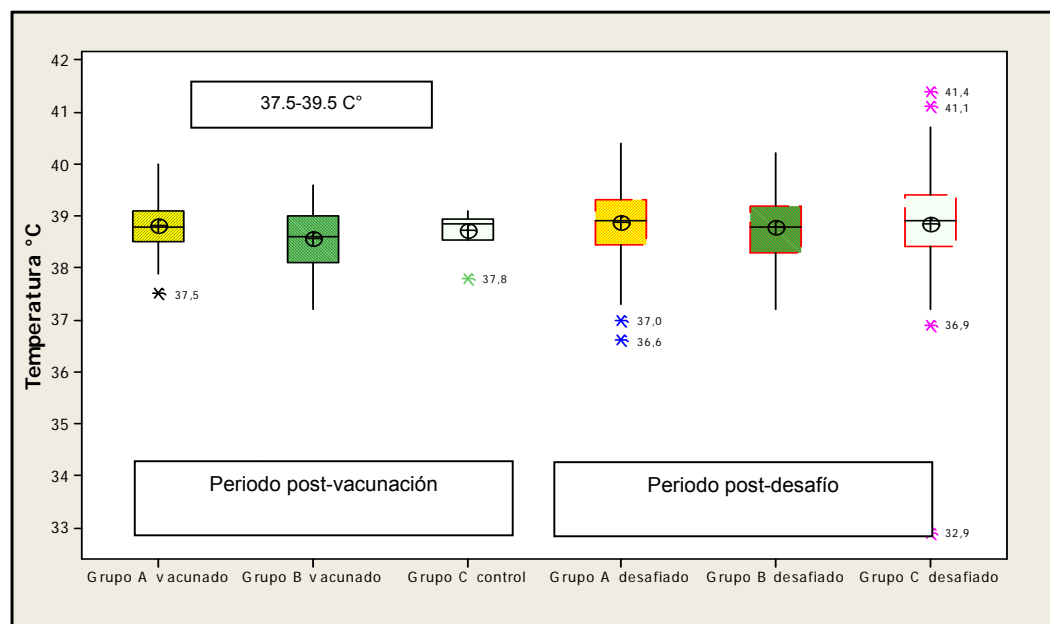


Figura 3. Medición de la temperatura en °C de los grupos A-B-C vacunados y desafiados. Donde se observó que el grupo C después del desafío mostró una mayor variación de la T° con cambios extremos de la misma. (I.C. 95%)

3.3.2 Valoración de la condición clínica de los animales al momento del sacrificio

Para este caso respecto a la condición clínica de los animales al momento del sacrificio se encontró diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los grupos (A, B y C), pero quizás como lo demostró el análisis de frecuencia y la valoración establecida (Anexo 7) para la evaluación de la condición clínica, se observó que las mayores diferencias se encontraron en el grupo control sin vacunar (Grupo C), el cual fue desafiado con cepa Santander. Se debe tener en cuenta que el animal "3C" fue un animal sacrificado antes del desafío viral con la cepa de campo. El restante de los animales de este grupo presentó características clínicas compatibles con PPC, como son la debilidad y apatía, no consumo de agua y alimento, signos nerviosos (cerdo 4C y 6C), conjuntivitis, cianosis de las orejas y solamente un animal falleció en este periodo el cual correspondió al "6C".

3.3.3 Recuento de glóbulos blancos

Se encontraron diferencias significativas después del desafío entre los grupos en la mayoría de periodos de toma de muestras, pero en particular para el grupo "C" fue en donde se encontraron mayores diferencias ($p \leq 0.05$), a excepción del cerdo "3C" en cual fue sacrificado antes del reto sirviendo este como control.

Para los grupos A y B (grupos vacunados) no se observaron cambios en la población en general en el recuento de glóbulos blancos. En el presente trabajo solamente se observó para el caso de los cerdos 5A una reducción en el recuento leucocitario, posiblemente este asociado al cuadro clínico respiratorio que mostró este animal. Por otra parte, en algunos animales se evidenciaron cambios en el recuento, como es el caso de los cerdos 10A, 10B, 11B y 12B, pero analizando los diferentes periodos de muestreo entre y dentro los grupos no se evidencio una correlación o efecto del virus vacunal o efecto del virus de campo en los animales vacunados. Por el contrario, se pudo observar que la respuesta vacunal no generó cambios significativos en el recuento leucocitario para el caso de las dos vacunas utilizadas (grupo A y B) (Figura 4), en donde se detectó una leve reducción en el recuento para los grupos vacunales, respecto al grupo control, sin que estos se salieran de los rangos normales para la especie.

Como excepción en relación al recuento leucocitario se encontraron los cerdos 10A y 10B. El primero presentó una reducción en el recuento leucocitario después de la vacunación, como después del reto, presentando este animal un cuadro clínico respiratorio. Para el caso del cerdo 10B hubo una reducción en el recuento leucocitario después de la vacunación, sin que se pudiera relacionar directamente esto con el efecto de la vacuna, ya que en el restante de la población de este mismo grupo no se detectaron cambios significativos (Anexo H).

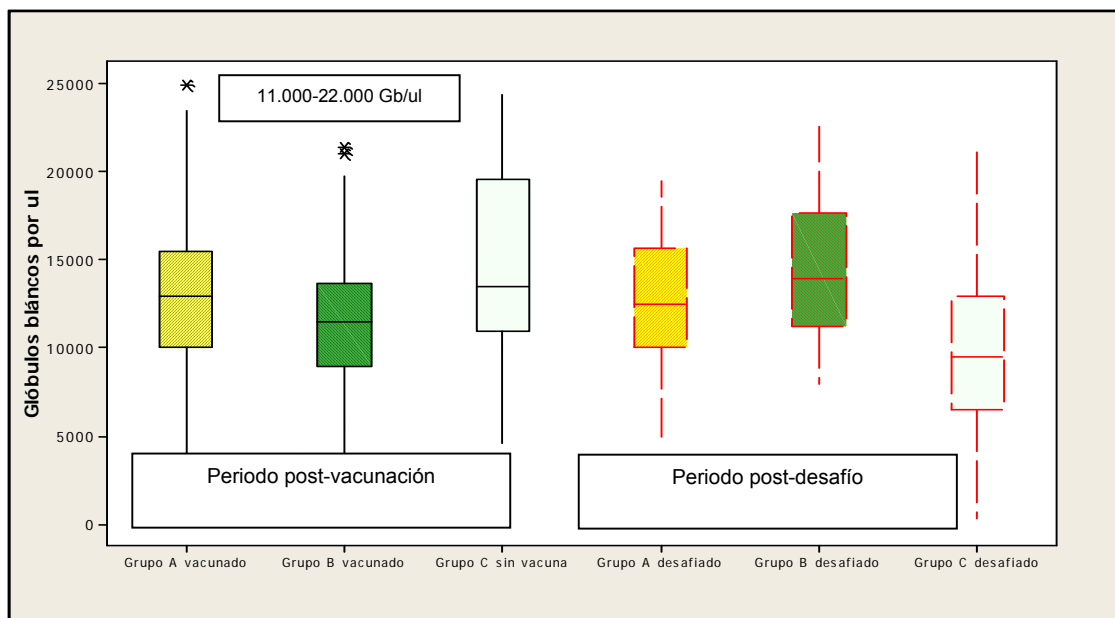


Figura 4. Recuento leucocitario por μl de los grupos A-B-C vacunados y desafiados. Se observó una leve reducción en el recuento leucocitario no significativa en los grupos vacunados antes del desafío respecto al control y en donde se encontró una reducción marcada para el grupo C después del desafío. (I.C. 95%)

3.3.4 Hallazgos macroscópicos

En la evaluación de los hallazgos macroscópicos se encontraron diferencias significativas entre los grupos ($p \leq 0.05$) con presentación de lesiones variables pero significativas asociadas particularmente en el grupo "C". Como hallazgos de importancia en este experimento en los grupos vacunados A y B, se encontró: aumento en el tamaño del bazo, sin la presentación de hemorragias en el mismo, en los animales 5A, 6A, 7A, 9A, 10A y 12A. Aumento en el tamaño de los ganglios linfáticos en los animales 5A, 6A, 7A, 9A, 10A, 12A y 12B. En los animales 6B y 12B se encontraron algunas hemorragias en pelvis renal, estando estas asociadas al método de sacrificio. En el animal 4B se evidenció una pleuritis crónica de posible origen bacteriano.

Para el grupo "C", grupo control no vacunado se encontraron lesiones atribuibles a PPC, las cuales estarían relacionadas con la condición clínica al momento del sacrificio o muerte de los animales. Se debe tener en cuenta que la presentación y el tipo de lesiones fueron variables entre los diferentes animales del grupo control, pero importantes con respecto a los grupos vacunales, a los cuales no se les identificaron lesiones relevantes que se puedan asociar a PPC. Estas lesiones se caracterizaron por la presentación de hemorragias en piel (Figura 5) (cerdo 1C), hemorragias en ganglios linfáticos (cerdos 1C, 2C, 4C, 5C y 6C), aumento en el tamaño de los ganglios linfáticos (cerdos 1C y 6C), hemorragias en pelvis renal (cerdos 1C, 2C, 5C y 6C), edema pulmonar y pleuritis (Figura 6) (cerdos 4C y 6C), conjuntivitis (cerdos 1C, 2C, 4C y 6C), úlcera gástrica (cerdos 4C y 5C), hemorragias pulmonares (2C y 6C) y congestión meníngea (2C, 4C y 6C).

Es claro que algunas de las lesiones observadas durante la necropsia se correlacionaron con la condición clínica como son: la presentación de tos y problemas respiratorios, con los hallazgos de pleuritis a la necropsia en los cerdos 4B, 4C y 6C (Figura 6 y Anexo G).



Figura 5. Cerdo 4C, el cual presentó hemorragias en piel y ulceraciones en las áreas articulares de las extremidades.

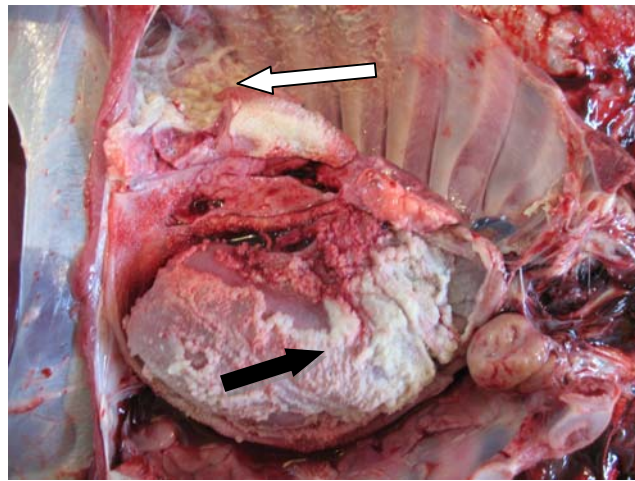


Figura 6. Cerdo 4C, el cual presentó pleuritis (flechas blanca) y epicarditis (flecha negra) fibrinosa severa de posible origen bacteriano.

3.3.5 Hallazgos microscópicos

En relación a las lesiones microscópicas en los tres grupos experimentales no se encontraron diferencias significativas ($p \geq 0.05$) entre los grupos (A y B vs C) (Anexo I), las cuales particularmente fueron más relevantes en el grupo control "C". Como lesiones importantes y a tener en cuenta se encontró la detección de lesiones vasculares en ganglios linfáticos y bazo, en lo referente a vasculitis, necrosis de las células endoteliales, hemorragia perivascular, hialinización y edema de la pared de los vasos sanguíneos. No se observaron lesiones microscópicas en los grupos A y B, a excepción de un cerdo del grupo "B" (4B), el cual presentó lesiones leves caracterizadas por presentar hemorragias perivasculares en riñón, sin reacción inflamatoria en el endotelio vascular, posiblemente asociadas al método de sacrificio como ya se mencionó.

En los cerdos del grupo control "C", desafiados pero no vacunados, presentaron lesiones vasculares ligeras así: el cerdo "C3" que actuó como control (sacrificado al 6 día de experimentación) no presentó ningún tipo de lesiones vasculares en los diferentes tejidos evaluados. En el restante de los animales de este grupo, los cuales fueron retados, se encontró en los cerdos 1C y 2C lesiones vasculares leves en bazo y ganglios linfáticos, pero no en el restante de tejidos evaluados. Para el caso del cerdo 4C se identificaron lesiones vasculares moderadas en ganglio linfático y piel, más no en el restante de tejidos. En el cerdo 6C se encontraron lesiones leves en piel, moderadas en ganglio

linfáticos y marcadas en bazo y riñón. El cerdo 5C no presentó lesiones vasculares en ninguno de los tejidos evaluados.

En lo referente a cambios apoptóticos (fragmentación nuclear) y de detección en el tejido linfoide como son ganglio linfático, bazo y tonsila, se encontraron animales sin lesiones o animales con lesiones leves a moderadas en los grupos vacunados y desafiados (A y B), sin que se defina un patrón de presentación que se pueda relacionar con el efecto de la vacunación o del desafío. El cerdo 4B presentó lesiones marcadas en bazo y ganglio linfático, pero quizás se debió al cuadro respiratorio (pleuritis) que presentaba. Respecto al grupo "C", los animales 1C, 2C, 4C, 5C y 6C presentaron algún tipo de lesión con grados variables de leves a marcados en ganglio linfático, bazo y tonsila (Figuras 7, 8 y 9). De esta forma se demostró el compromiso de las células mononucleares presentes en tejidos linfoides producto del efecto infeccioso del virus de PPC.

Examinando la presentación de lesiones en encéfalo, se encontró que para el grupo "A" los animales 4A, 5A, 6A, 8A, 9A, 12A presentaron lesiones ligeras caracterizadas infiltración perivascular en vasos del encéfalo y gliosis difusa y focal (regiones evaluadas en los tres grupos: corteza región occipital, hipocampo, cerebelo, base de encéfalo e inicios de médula oblonga). En el grupo "B" solamente los animales 2B y 3B presentaron este mismo tipo de lesiones. En general estos cambios fueron no significativos, sin que se pudiesen relacionar con PPC, debido a la ausencia de lesiones sistémicas que se puedan relaciona con esta enfermedad. Para el grupo "C" se encontraron lesiones marcadas en los animales 4C y 6C y leves en el 1C (Figura 11 y 12). Los animales 2C, 3C y 5C no presentaron ningún tipo de lesión en encéfalo.

Es claro que para el análisis de frecuencia realizado a los tres grupos en simultaneo se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos para las lesiones microscópicas descritas, menos en lo referente a cambios depléticos en bazo y tonsila en donde no se encontraron diferencias significativas, pero se observó un patrón de presentación de lesión muy similar entre los grupos.

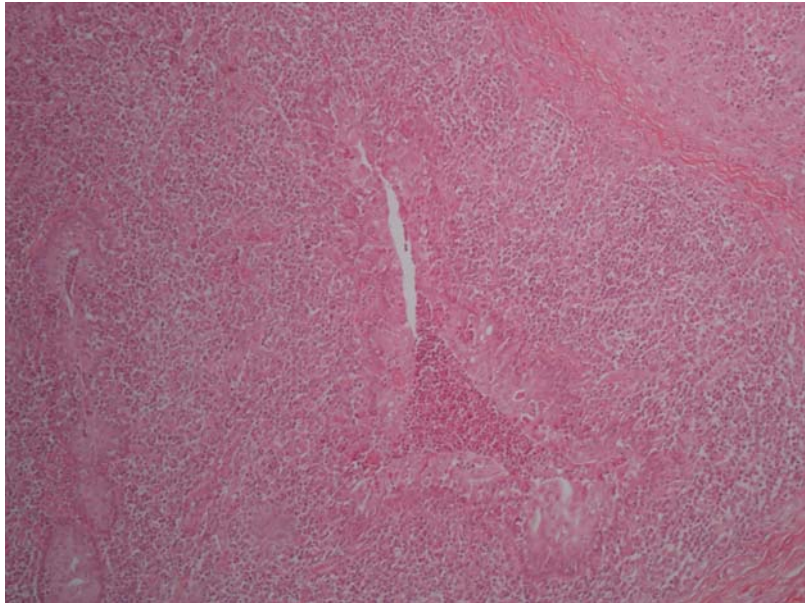


Figura 7. Cerdo 4C. Tonsila, se evidenció cambios depléticos en los folículos linfoides y criptitis necrótica con presencia de material exudativo en su luz – HE-100X

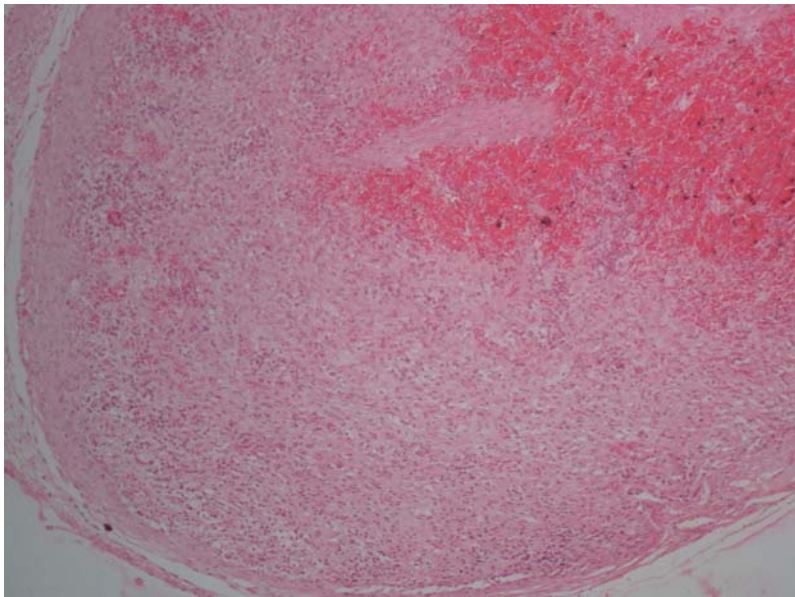


Figura 8. Cerdo 4C. Ganglio linfático, se observaron severos cambios depléticos generalizados y áreas de congestión - HE-100X

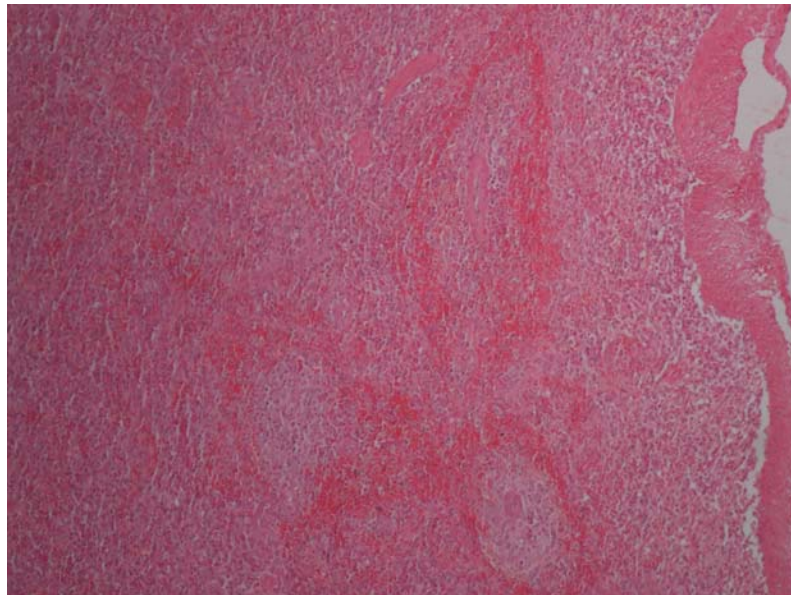


Figura 9. Cerdo 4C. Bazo, se observó severos cambios depléticos generalizados en los centros germinales en áreas T y B - HE-100X

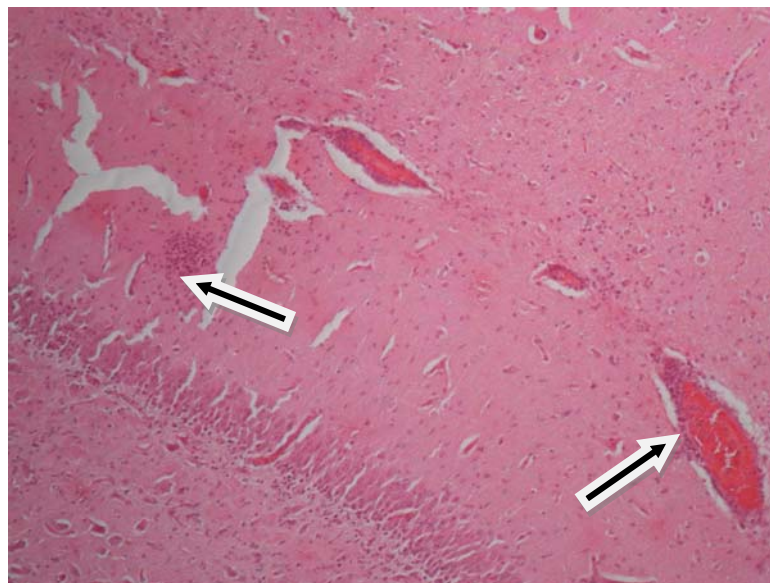


Figura 10. Cerdo 4C. Hipocampo, se evidenció la presencia de un infiltrado perivascular mononuclear y focos de gliosis, como lo indican las flechas - HE-100X

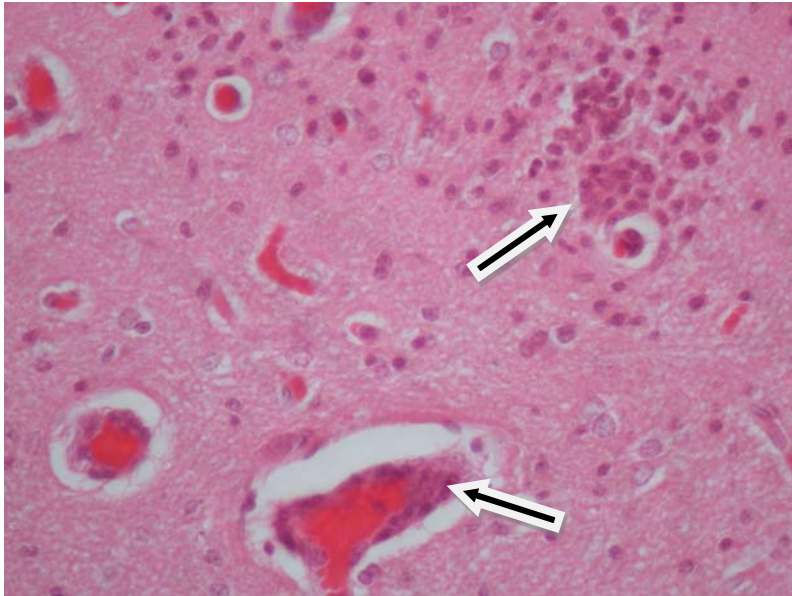


Figura 11. Cerdo 4C. Hipocampo, se encontró la presencia de un infiltrado mononuclear y focos de gliosis, como lo indican las flechas- HE- 400X

3.3.6 Detección del antígeno de PPC por inmunohistoquímica (IHQ)

En los animales vacunados de los dos grupos (A y B) no se detectó el antígeno vacunal ni de desafío. En contraste para el grupo "C" solamente en dos animales se identificó el antígeno de desafío (cepa Santander) identificándose este en tejidos como pulmón (Figura 12 y 13), membrana nictitante (Figura 14), tonsila (Figura 15 y 16), cornete, médula ósea, con inmunomarcación moderada en dos cerdos (4C y 6C). Se debe destacar que el antígeno de PPC se detectó en forma marcada solamente en el intestino delgado (íleon) y en forma leve en hígado y en ganglio linfático. Es importante observar que para el caso del cerdo 6C se identificó el antígeno en todos los tejidos respecto al cerdo 4C. Por otra parte, se identificó el antígeno viral en piel (Figura 17) en encéfalo (Figura 18) con diferentes grados de inmunomarcación en los cerdos (4C y 6C). En los cerdos 1C, 2C y 5C no se detectó el antígeno de desafío en los tejidos examinados (Anexo K).

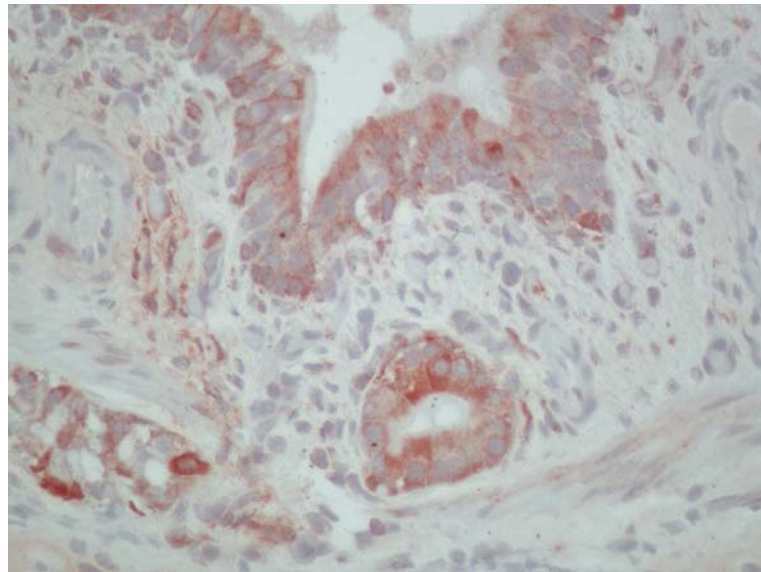


Figura 12. Cerdo 6C grupo control. Pulmón, se detectó el antígeno viral (inmunomarcación) en el bronquiolo (células de la lámina propia) - Hematoxilina de Meyer - 400X

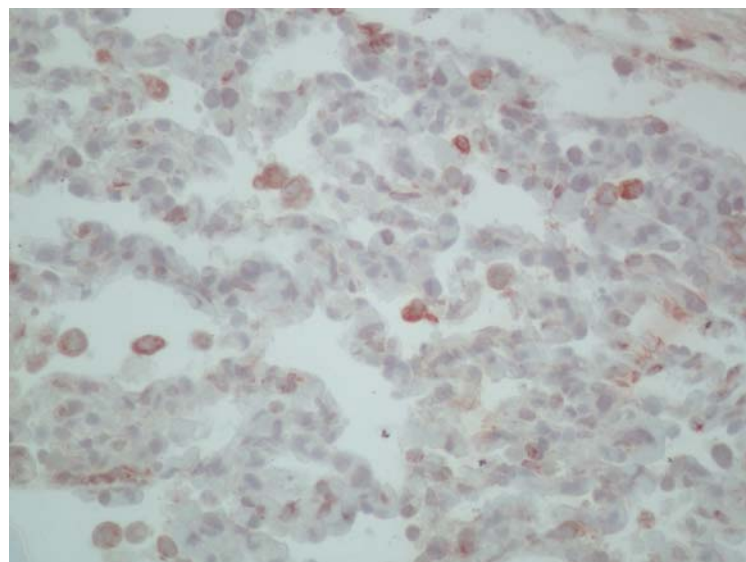


Figura 13. Cerdo 6C grupo control. Pulmón, se detectó el antígeno viral (inmunomarcación) dentro de macrófagos alveolares - Hematoxilina de Meyer - 400X

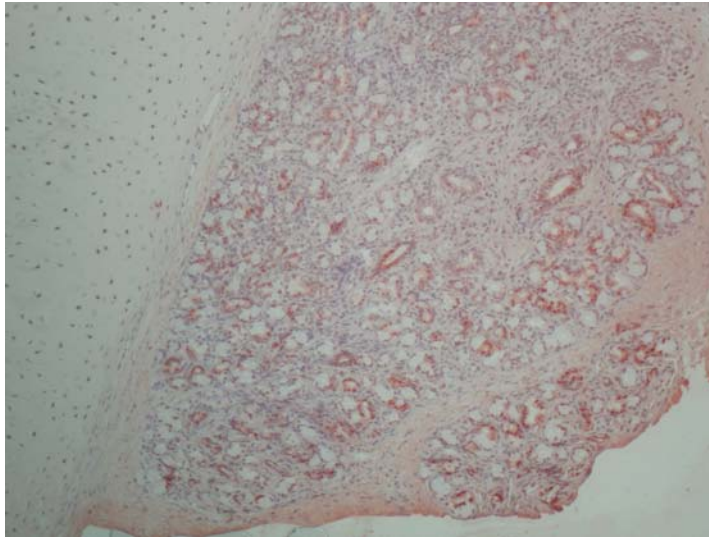


Figura 14. Cerdo 6C grupo control. Membrana nictitante, observe la detección del antígeno viral (inmunomarcación) en células de las glándulas - Hematoxilina de Meyer - 100X

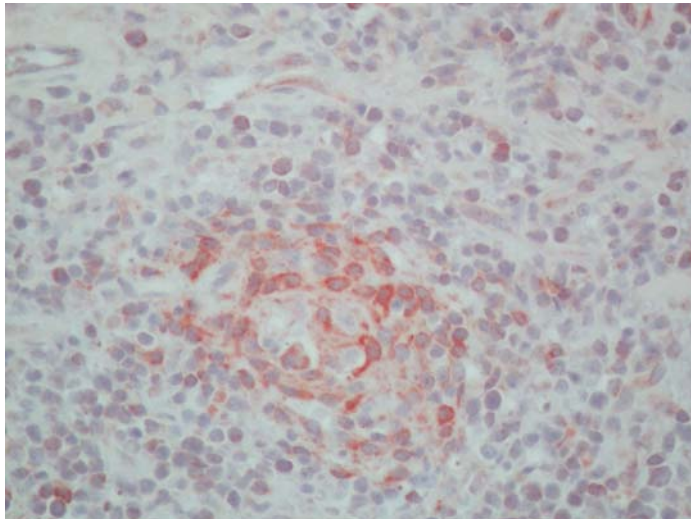


Figura 15. Cerdo 6C grupo control. Tonsila, se puede apreciar la detección del antígeno viral (inmunomarcación) en linfocitos de los centros germinales - Hematoxilina de Meyer - 400X

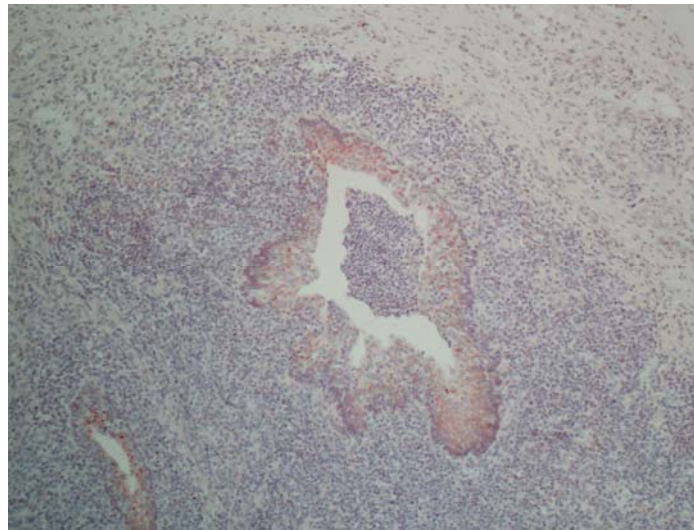


Figura 16. Cerdo 4C grupo control. Tonsila, note la detección del antígeno viral (inmunomarcación) en células de la capa epitelial de las criptas - Hematoxilina de Meyer - 100X

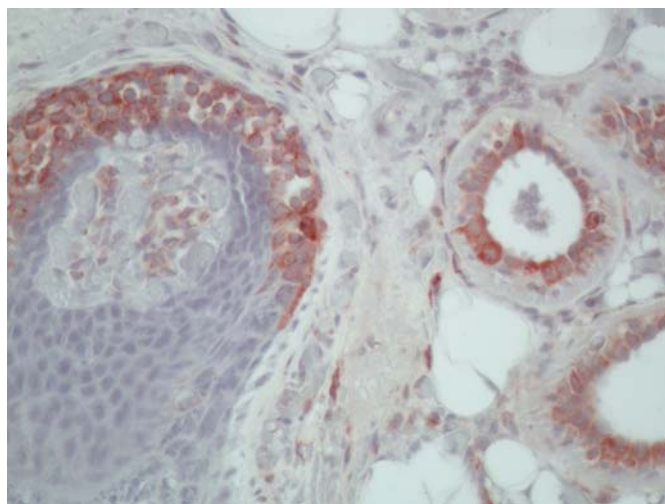


Figura 17. Cerdo 6C grupo control. Piel, observe la detección del antígeno viral (inmunomarcación) en piel en células del folículo piloso y glándulas sudoríparas - Hematoxilina de Meyer - 400X

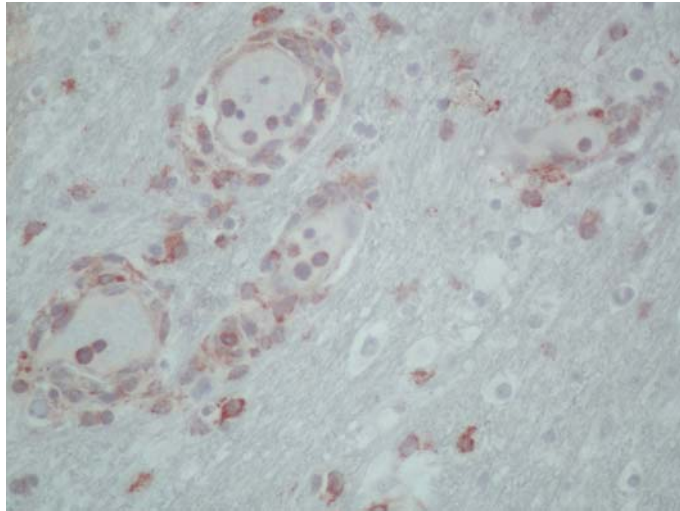


Figura 18. Cerdo 6C grupo control. Encéfalo, es importante observar la detección del antígeno viral (inmunomarcación) en encéfalo en la pared de los vasos sanguíneos y en el infiltrado mononuclear perivascular - Hematoxilina de Meyer - 400X

3.3.7 Detección de anticuerpos frente a PPC por medio de la utilización de la prueba de ELISA

En este experimento con el fin de evaluar la respuesta serológica con las prueba de ELISA se utilizaron dos kits comerciales, pero no se llevó a cabo una comparación de sensibilidad o especificidad entre ellos. Se encontró que antes de la vacunación y del desafío algunos de los animales tenían anticuerpos detectables, de posible origen materno cuya distribución fue: tres animales del grupo A (3A, 5A y 12A), cuatro del grupo B (1B, 5B, 6B y 3B) y uno sospechoso del grupo C (5C) (Anexo L). Por otra parte, para los tres grupos de animales se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) particularmente después del desafío, en los diferentes periodos de muestreo realizados en el experimento. En general, para los tres grupos se evidenció un aumento en los niveles de anticuerpos posterior al desafío demostrando la respuesta serológica (Anexo L). En la Figura 18 se presenta la sumatoria de positivos y sospechosos para el total del grupo examinados por día, según la evaluación efectuada con las pruebas de ELISA utilizadas.

Para el caso de los animales 3A y 1B se detectaron anticuerpos por las dos pruebas y se observó aumento en los niveles de anticuerpos posterior a la vacunación, siendo estos detectables hasta el día 8 del experimento, en donde estos animales fueron sacrificados.

Para los animales 5A y 5B se encontró que estos dos animales presentaron un alto nivel de anticuerpos al día 1, los cuales se relacionan con anticuerpos maternos. Para estos dos animales luego se observó una reducción en el nivel de anticuerpos durante el experimento evidenciándose esto con los dos kits de ELISA utilizados, en donde para el animal 5A es tan marcada la reducción de anticuerpos que este se hizo sospechoso al día 16 hasta el 20 día de sacrificio, siendo esto muy similar con el 5B. Por otra parte, los cerdos 12A, 3B y 6B mostraron niveles bajos de anticuerpos maternos al día 1, los cuales se incrementaron post-vacunación y luego disminuyeron antes del desafío.

Es claro que la gran mayoría de animales de los grupos A, B y C no presentaron anticuerpos maternos detectables al día 1 antes de la vacunación y durante los días antes del reto (día 16), esto sugiere que la aparición de anticuerpos detectables por ELISA puede tardar mayor tiempo en relación a la respuesta post-vacunal, ya que solamente en los animales 2B, 8B y 11B se detectaron anticuerpos siendo algunos de estos positivos o sospechosos antes del desafío y asociados estos a la vacunación.

Posterior al día 16 (día del desafío) se observó que en los grupos de animales vacunados (A y B) la aparición de anticuerpos es más temprano con respecto al grupo de animales no vacunados correspondientes al grupo "C", en donde los anticuerpos para este grupo de animales comenzaron a aparecer al día 26 del experimento en respuesta a la cepa de desafío (cepa Santander). Esto quizás para el caso del grupo A y B en la segunda exposición al antígeno (antígeno de desafío) se potencia la respuesta inmune (respuesta anamnésica) generando la aparición de anticuerpos de forma más rápida.

Para nuestro caso, se encontró que para aquellos animales que no presentaron anticuerpos al inicio de la vacunación presentaron anticuerpos detectables por ELISA verdaderamente positivos de la siguiente forma: 2B al día 16, 8B a los 16 días, 4A y 7A se detectaron anticuerpos a los 22 días y 9A, 11A, 7B y 12B a los 24 días, pero se debe tener en cuenta el posible efecto del virus de desafío en la aparición más temprana para el caso de los animales 2B y 8B.

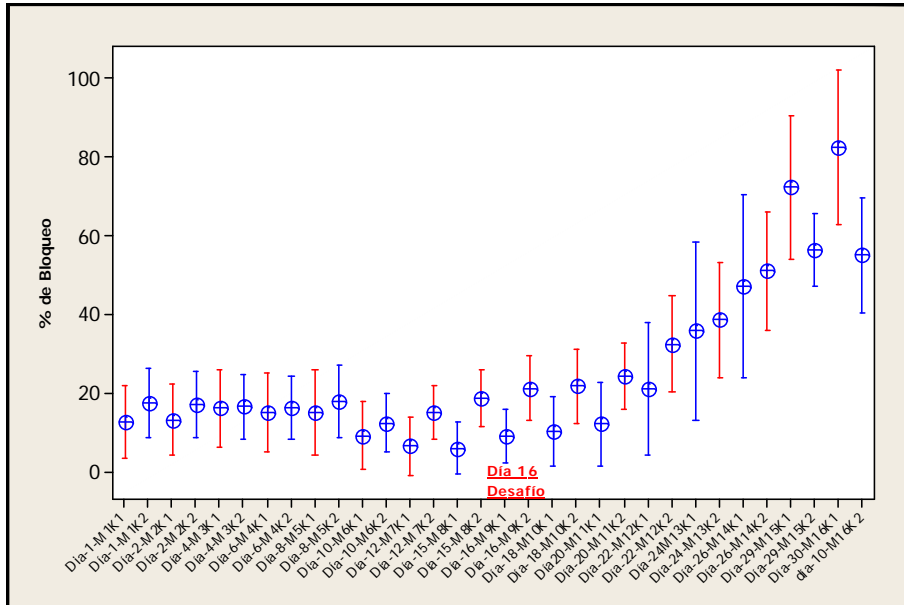


Figura 19. Gráfico de intervalos donde se agrupan los datos de las pruebas de ELISA-Ac (Prionics®-kit 1 y Idexx®-kit 2) para el total de los animales por muestreo (día), en el cual se observó una reducción antes del desafío y un incremento en la distribución y el porcentaje de bloqueo de las ELISAs a partir del muestreo 10 (Desafío), hasta el final del experimento. "M" representa tiempo de muestreo y "K" el kit utilizado - (IC 95%).

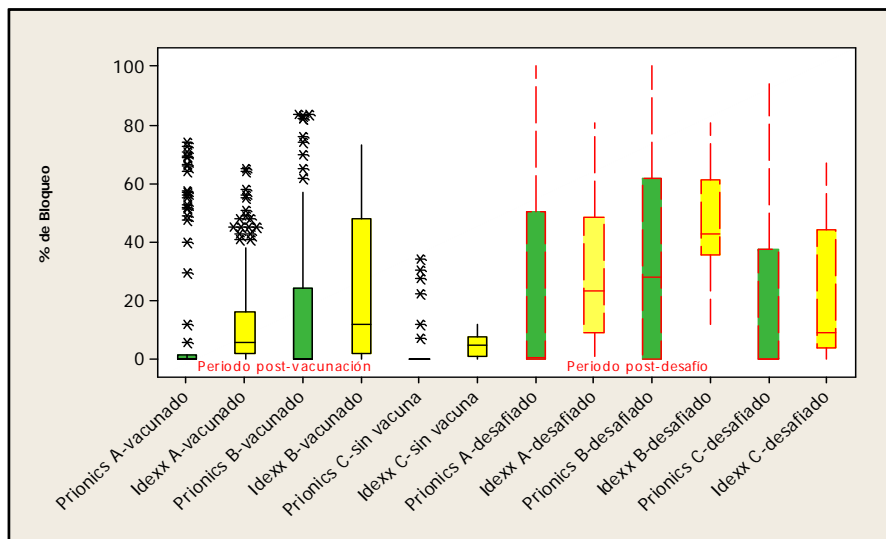


Figura 20. Detección de anticuerpos por ELISA Prionics® y Idexx® de los Grupos A-B-C vacunados y desafiados, donde se observó que para cada uno de los grupos hay una mayor dispersión de los datos e incremento en el valor de porcentaje de bloqueo en la prueba de ELISA después del desafío, lo cual refleja un incremento de los niveles de anticuerpos (IC 95%).

3.3.8 Detección de anticuerpos frente a PPC por medio de la utilización de la prueba de seroneutralización (NPLA)

Esta metodología solo se utilizó para dilucidar la respuesta a los análisis positivos y negativos obtenidos con las pruebas de ELISA. Se evaluaron por NPLA los animales antes de la vacunación para establecer la presencia de anticuerpos maternos neutralizantes y en aquellos casos en donde los animales no presentaron títulos de anticuerpos antes y después de la vacunación y después del reto. Se encontró que para el grupo A los animales 1A, 2A, 4A, 6A, 7A, 8A, 9A, 10A y 11A no presentaron anticuerpos neutralizantes, con respecto a los animales 3A, 5A y 12A que presentaron anticuerpos neutralizantes (anticuerpos maternos) antes de la vacunación. Para el grupo B los animales 2B, 4B, 7B, 10B, 11B y 12B no presentaron anticuerpos neutralizantes, con respecto a los animales 1B, 3B, 5B, 6B, 8B y 9B. Para el grupo C se encontró solamente un animal positivo con anticuerpos neutralizantes el cual correspondió al 5C. En el caso de los sueros sospechosos por ELISA se encontró que estos en su mayoría presentaron algunos títulos bajos pero positivos por NPLA (Anexo L).

3.3.9 Detección de antígeno de PPC mediante la utilización de dos kits comerciales de ELISA- Ag

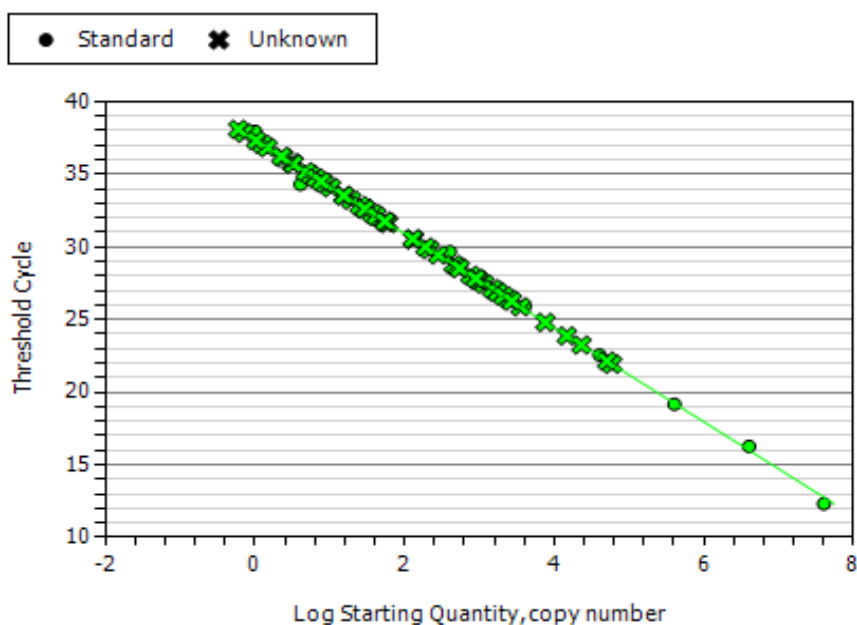
Se utilizaron dos kits de ELISA comerciales para la identificación de antígeno vacunal o desafío, pero no se llevó a cabo una comparación de sensibilidad o especificidad entre ellos. Todas las muestras de sueros obtenidas en los 16 muestreos realizados durante el periodo de experimentación se analizaron con estos dos kits y como hallazgo importante se encontró que para los grupos A y B no se identificó la presencia del antígeno ni vacunal ni de desafío (Anexo M).

La presencia y el momento de detección del antígeno viral en suero de los animales del grupo control fue variable entre los individuos, lo cual se puede relacionar con la variación de la viremia en cada individuo. Se observó que el antígeno de desafío en el grupo "C" se comenzó a detectar en el animal 1C al día 20 hasta el día 24, siendo detectado solamente por el kit de ELISA Ag Idexx®, cuatro días posterior al reto. Los cerdos 4C y 6C presentaron detección de antígeno al día 18 en el cerdo 4C hasta el día

29 y en el cerdo 6C al día 20 hasta el 29. Para el resto de animales de este grupo los cerdos 2C y 5C, no se detectó el antígeno de desafío en sueros en los periodos muestreados y analizados por esta metodología.

3.3.10 Curva estándar de cuantificación por RT-qPCR 5'UTR

Con el objetivo de cuantificar la carga viral, se realizó una curva estándar a partir de la del producto de PCR de la cepa de referencia Alfort/187, cuya concentración fue de 33.64ng/μl. Se realizaron diluciones con base diez 10^{-1} hasta 10^{-12} para establecer la curva estándar y poder realizar la cuantificación viral. Esta mostró una eficiencia del 103.7% y un R^2 de 0.996 con una pendiente de -3.236.



Fluor	PCR Efficiency(%)	R Squared	Slope	y-Intercept
FAM	103.7	0.996	-3.236	37.374

Figura 21. Curva estandar de la RT-qPCR 5'UTR a partir del ARN de la cepa de referencia Alfort/187, en diluciones con base diez la cual comprende circulos sobre la recta y la distribución de muestras positivas (sueros, leucocitos, tonsila, pool de tejidos e hisopos) que se designaron por medio de cruces.

3.3.11 Detección del ácido nucleico de PPC por RT-PCR anidada E2 y RT-qPCR 5' UTR en sueros, leucocitos, hisopados nasales, rectales y tejidos

Mediante la utilización de RT-PCR anidado se buscó detectar el segmento E2 y por la RT-qPCR el segmento 5'UTR del virus de PPC en sueros, leucocitos, pools de hisopados nasales, rectales y tejidos en forma individual (tonsila) y en pools de tejido linfóide (bazo y ganglios linfáticos).

Por RT-PCR anidada E2 se encontró que para los días muestreados en los grupos A y B para el caso del antígeno vacunal y de desafío utilizados en cada grupo no se detectó en suero ni en leucocitos el ácido nucleico del virus de PPC. En el grupo C se detectó el ácido nucleico del virus de campo en los animales 4C y 6C a partir del día 18 que corresponde al muestreo número 10, lo cual concuerda con el día 2 posterior al reto, extendió la detección del ácido nucleico viral en sueros hasta el día 29 del experimento, detectándose entonces por 12 días (Anexo O). En relación a la RT-qPCR 5'UTR se encontró que para el caso del grupo A y B no se detectó antígeno vacunal o de reto en la gran mayoría de animales, solamente en el cerdo 9A por RT-qPCR se detectó el ácido nucleico (Ct 37.22) en leucocitos al día 18, dos días posterior al reto encontrándose posiblemente el ácido nucleico de antígeno de desafío (Anexo O).

Para el grupo "C" se encontraron diferencias respecto a la detección por RT-PCR- E2 y la RT-qPCR 5'UTR entre las técnicas y respecto al tipo de muestra (sueros y leucocitos). Para el cerdo "3C" no se detectó ácido nucleico del virus, ya que fue un cerdo el cual no fue retado, sirviendo las muestras colectadas de este animal como control negativo. Para los animales restantes del grupo control "C" se evidenció mayor detección por la RT-qPCR 5'UTR con respecto a la RT-PCR E2 tanto en suero como en leucocitos y con respecto a las muestras se encontró mayor detección en leucocitos por ambas metodologías.

Se encontró que solamente se detectó ácido nucleico en pools de sueros en el cerdo 9A en los grupos vacunales y desafiados, siendo este animal solamente identificado por RT-qPCR 5'UTR. Para el caso del grupo C en pools de sueros se detectaron solamente los cerdos 4C y 6C por RT-PCR E2; detectándose dos animales más por RT-qPCR 5'UTR

(1C y 5C) lo cual podría sugerir una mayor sensibilidad de esta técnica. Se observó que la realización de pools de sueros aparentemente no redujo la habilidad de detección de las técnicas moleculares.

En relación a la excreción viral al evaluar los pools de hisopados nasales se encontró que por la RT-PCR E2 se detectó la excreción en dos animales del grupo control (4C y 6C), siendo detectado un animal mas del grupo control 1C y dos más del grupo A, los cuales fueron los cerdos 7A y 10A por RT-qPCR 5'UTR, lo cual podría inferir una mayor sensibilidad de esta técnica.

En con respecto a los hisopos rectales se encontró que para los animales vacunados solamente en los pools de los animales 1A, 2A, 2B se detectó por RT-qPCR 5'UTR el ácido nucleico del virus vacunal, ya que fueron animales sacrificados antes del reto (1A y 2A) o de desafío para el caso del animal 2B. Para los animales del grupo C se detectó solamente en los animales 4C y 6C por RT-qPCR 5'UTR (Tabla 4).

Tabla 4. Detección del Ácido Nucleico del Virus de PPC en Pool de sueros, hisopados nasales y rectales por RT-PCR E2 y RT-qPCR 5'UTR según el momento del sacrificio

Grupo	RT-PCR E2	RT-qPCR 5'UTR	RT-PCR E2	RT-qPCR 5'UTR	RT-PCR E2	RT-qPCR 5'UTR
	Pools de Sueros	Pools de Sueros	Pools de Hisopos Nasales	Pools de Hisopos Nasales	Pools de Hisopos Rectales	Pools de Hisopos Rectales
A	0 de 12	1 de 12	0 de 12	2 de 12	0 de 12	2 de 12
B	0 de 12	0 de 12	0 de 12	1 de 12	0 de 12	1 de 12
C	2 de 6	4 de 6	2 de 6	3 de 6	0 de 6	2 de 6
Total	2 de 30	5 de 30	2 de 30	5 de 30	0 de 30	5 de 30

Tratando de detectar el antígeno de PPC tanto vacunal como de desafío en de tejidos se realizó RT-PCR anidada E2 y RT-qPCR 5'UTR en tejidos evaluándolos en forma individual y en pools de bazo y ganglios linfáticos (submandibulares, bronquiales, mesentéricos y inguinales superficiales) (Tabla 5) (Anexo N). Se encontró que la RT-PCR anidada E2 y RT-qPCR 5'UTR antes del reto en todos los animales vacunados, lo mismo sucedió en el cerdo 3C del grupo control (animal no vacunado) no se detectó el antígeno

vacunal en tejidos en forma individual o en pooles. Después del desafío de los grupos vacunados A y B, se encontró que en un solo animal el cerdo 5A se detectó posiblemente el antígeno de desafío 4 días después del reto por RT-PCR anidada E2. Para el caso del grupo control "C" por esta misma metodología se detectó el antígeno de desafío así: cerdo 2C en tonsila solamente, en el cerdo 4C en tonsila, bazo, médula ósea, intestino, ganglios linfáticos mesentéricos y cerebro. Para el cerdo 6C en tonsila, riñón, pulmón, ganglios linfáticos submandibulares, bazo, médula ósea, intestino, ganglios linfáticos mesentéricos y cerebro. De igual forma en pooles de bazo y ganglios linfáticos se detectó en antígeno de campo en estos dos animales (4C y 6C). Es importante tener en cuenta que solo en estos dos animales en pooles de bazo y ganglios linfáticos se detectó el antígeno de reto. En los cerdos 1C y 5C no se detectó antígeno de desafío en tejidos en forma individual y en tonsila (Figura 22).

Respecto a la RT-qPCR 5'UTR la cual se utilizó únicamente para evaluar tonsila en forma individual y pooles de bazo y ganglios linfáticos, se encontró que para los animales vacunados y sacrificados antes del reto no se detectó el antígeno vacunal. Después del reto se detectó posiblemente el antígeno de desafío en tonsila así: para el grupo "A" los animales 4A, 7A, 9A, 10A, 11A y 12A y para el caso del grupo "B" se detectó en los animales 6B, 7B, 8B, 11B y 12B. Se debe destacar que la posible detección del antígeno de desafío en los dos grupos vacunales se presentó desde el día 20 hasta el día 30 del experimento. En los animales del grupo control "C" en los cerdos 2C, 4C y 6C (Anexo N).

Con relación a los pooles de bazo y ganglios linfáticos se determinó que solamente se detectó posiblemente el antígeno de descarga en un solo grupo vacunal siendo estos los cerdos 5A y 11A. Con respecto al grupo control "C" en el análisis de pooles de bazo y ganglios linfáticos por RT-qPCR 5'UTR solamente se detectó el antígeno de desafío en los cerdos 4C y 6C. Se podría decir que la RT-qPCR 5'UTR es más sensible al momento de hacer la detección del ácido nucleico del virus de PPC y quizás el órgano de detección principal fue la tonsila como se determinó en este experimento (Anexo N).

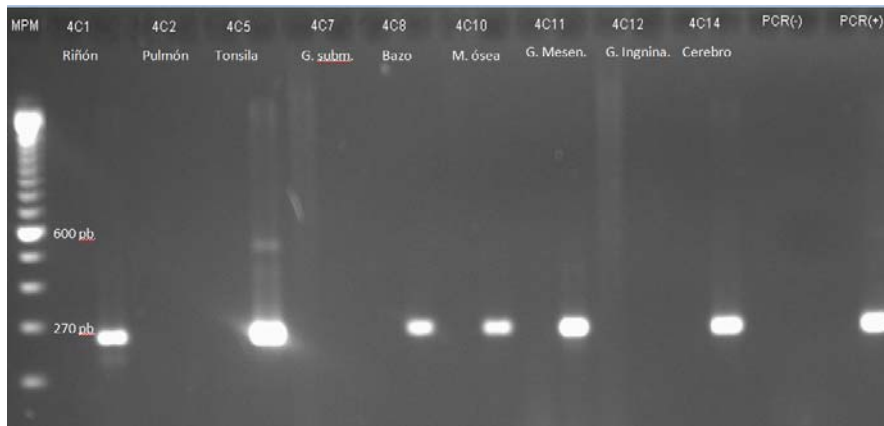


Figura 22. Detección por RT-PCR anidada E2 en tejidos del cerdo 4C. El carril número 1 de izquierda a derecha, corresponde al marcador de peso molecular seguido de la PCR1 y PCR2 de los tejidos como son: riñón, pulmón, tonsila, ganglios linfático submandibular, bazo, médula ósea, ganglio mesentérico y cerebro. Los cuatro últimos carriles corresponden al control de extracción y el control positivo (cepa Alfort/187).

Tabla 5. Detección del Ácido Nucleico del Virus de PPC en tejidos, pool de bazo y ganglios linfáticos por RT-PCR E2 y RT-qPCR 5'UTR

Grupo	RT-PCR E2 primera extracción										RT-qPCR 5'UTR	
	Riñón	Pulmón	Tonsila	Ganglios submandibulares	Bazo	Médula ósea	Intestino	Ganglios mesentéricos	Cerebro	Pool de Bazo y Ganglios linfáticos	Tonsila	Pool de Bazo y Ganglios linfáticos
A	0 de 12	0 de 12	1 de 12	0 de 12	0 de 12	0 de 12	0 de 12	0 de 12	0 de 12	0 de 12	7 de 12	2 de 12
B	0 de 12	0 de 12	0 de 12	0 de 12	0 de 12	0 de 12	0 de 12	0 de 12	0 de 12	0 de 12	5 de 12	0 de 12
C	2 de 6	1 de 6	3 de 6	1 de 6	2 de 6	2 de 6	2 de 6	2 de 6	2 de 6	2 de 6	3 de 6	2 de 6
Total	2 de 30	1 de 30	4 de 30	1 de 30	2 de 30	2 de 30	2 de 30	2 de 30	2 de 30	2 de 30	15 de 30	4 de 30

3.4 Aislamiento viral

Tratando de aislar el virus vacunal y de reto en cultivos celulares PK-15 en tres pasajes se realizaron inóculos de pools de tejidos linfáticos (tonsila, ganglios linfáticos submandibulares, bronquiales, mesentéricos, inguinales superficiales y bazo) siendo estos los órganos de elección para aislamiento viral en el diagnóstico de PPC. Se realizó este procedimiento con muestras de 22 animales en tres pasajes en cultivos celulares distribuidos como se muestra en la Tabla 6 (Anexo P). Se encontró que en los grupos vacunales no se aisló el antígeno vacunal ni de reto, lo cual podría deberse al alto grado

de atenuación del virus vacunal y a su alta capacidad inmunogénica que limita la replicación y permanencia del virus de desafío o campo. Solamente en los dos animales del grupo control "C" 4C y 6C se aisló el virus de desafío, siendo estos animales no vacunados.

Tabla 6. Aislamiento del Virus de PPC en pools de tejidos linfoides en cultivos celulares PK-15

Grupo	Primer pase	Segundo pase	Tercer pase
A	0 de 8	0 de 8	0 de 8
B	0 de 8	0 de 8	0 de 8
C	2 de 6	No realizado	
Total	2 de 22	0 de 16	0 de 16

4. Discusión

La presente investigación pretendió evaluar el efecto orgánico (clínico -patológico) y el comportamiento biológico de dos vacunas de virus vivo atenuado para el control de Peste Porcina Clásica (PPC), frente a un desafío experimental con una cepa campo, buscando establecer una guía estratégica de diagnóstico con el fin de contribuir a dar una interpretación epidemiológica de los resultados de laboratorio, para su aplicación en casos de campo en zonas sin vacunación y con vacunación en diferentes regiones del país.

Para dilucidar el ancestro de las cepas utilizadas en este experimento se realizó el análisis filogenético de la cepa de referencia Alfort/187, las cepas vacunales (vacuna A y B) y la cepa Santander, encontrándose que estas pertenecen al grupo 1 y subgrupo 1.1 en los cuales se agrupan un número importante de cepas virales incluso vacunales de PPC. Por otra parte, para establecer el grado de identidad entre las mismas cepas, se realizó un análisis de la matriz de distancia en donde se determinó un alto grado de homología entre las cepas vacunales y la cepa China, lo cual confirmó su ancestro común, tal como se ha reportado previamente en lo referente a las cepas vacunales elaboradas con esta cepa (80).

En relación al linaje de la cepa China y su protección cruzada con otros subgenotipos, se ha encontrado que la cepa China perteneciente al subgenotipo 1.1, es capaz de inducir un amplio rango de protección contra cepas virulentas (Aynaud 1988; Vandeputte et al., 2001, citados por Qiu et al., 2006) (44) incluyendo subgenotipos prevalentes como son el 2.1 y el 2.2, y los subgenotipos menos prevalentes en China como lo son el 2.3 y 1.1 (Tu et al., 2001; Tu 2003, citados por Qiu et al., 2006) (44).

Una vez realizado el experimento tendiendo a establecer la **condición clínica** de los animales producto de la vacunación o del desafío, se tomó la temperatura en diferentes

periodos tiempo en la totalidad de los animales. Para los grupos A y B se encontró que la gran mayoría de animales no se observaron cambios significativos en la temperatura durante el periodo de experimentación, presentándose algunas excepciones como es el caso de los cerdos 4A, 5A, 7A, 10A, 4B y 10B, los cuales mostraron un incremento en la temperatura en algunos días, posiblemente asociado a cuadros clínicos de diferente índole como son: neumonía y la pleuritis, lo cual comprobó en los datos recolectados para la valoración de hallazgos clínicos, lesiones macroscópicas y evaluación microscópica. En contraste, en el grupo C se encontraron condiciones variables en cuanto al aumento de la temperatura, signos clínicos, hallazgos macro y microscópicos, los cuales se relacionaron con la infección activa por el virus de desafío cepa Santander en animales sin vacunación.

Se debe destacar que en ningún grupo vacunado se observaron reacciones desfavorables locales y/o sistémicas derivadas o atribuibles a la aplicación del biológico, lo cual fue similar a lo encontrado por Villamil et al., (1999) (62) y Graham et al., (2010) (58).

Los hallazgos de la infección experimental de los cerdos del grupo control "C" con la cepa Santander, permitieron inferir que esta cepa viral es de moderada virulencia, teniendo en cuenta los signos y síntomas clínicos de grado moderado, lo mismo que la viremia. Handel et al., (2004), concluyeron que la sintomatología clínica y las lesiones macroscópicas dependen de la cepa de virus que infecte a los animales. Esta observación surgió de la comparación de una cepa de baja virulencia (Glentorf), moderada virulencia (Lelystad/97) y de alta virulencia (Alfort/ 187) (79).

En relación con los signos clínicos Elbers et al., (2002) encontraron en un estudio realizado en los países bajos (Europa) sobre la evaluación comparativa de **signos clínicos** en la detección de brotes de PPC durante una epidemia, que estos no son muy específicos, concluyendo que los signos que se asocian a un caso de PPC se pueden presentar sin que en realidad correspondan a un caso de la enfermedad, ya que los signos clínicos asociados muchas veces no son característicos y se debe hacer su diferenciación con otras enfermedades que ocasionan un proceso sistémico hemorrágico o un síndrome nervioso (81).

No obstante lo anterior, se reportó que el 75% de los brotes fueron detectados a partir de síntomas clínicos observados en granjas en Alemania y países bajos, demostrando esto que la valoración de los signos clínicos mediante una encuesta epidemiológica previamente establecida constituye una herramienta valiosa en la detección preliminar de casos de PPC. En el presente estudio en los animales del grupo control se observó debilidad y apatía, no consumo de alimento y agua, cuadro neurológico (inestabilidad al caminar y ataxia), conjuntivitis y diarrea, siendo estas condiciones frecuente en casos de enfermedad por PPC en porcinos (81).

Se logró demostrar con este trabajo que las vacunas no producen un efecto adverso sobre los animales vacunados y ofrecen un amplio efecto protector frente al desafío con la cepa Santander, al no presentarse signos clínicos, viremia evidente, ni lesiones macro o microscópicas en los grupos vacunados relacionadas con efectos del virus de PPC de desafío. Se debe aclarar que algunas lesiones detectadas de tipo inflamatorio no supurativo son inespecíficas y se pueden relacionar con otras entidades. En comparación con el estudio realizado por Villamil et al., (1998) en esta investigación no encontraron diferencias significativas en los rangos de temperatura días después de la vacunación y se correlacionó con la no presentación de signos clínicos atribuibles a las vacunas (62). Koenig et al., (2007) en una comparación realizada entre la vacuna de cepa China y una vacuna marcada, observaron que las dos vacunas no generaron cambios en la condición clínica o en los hallazgos a la necropsia, demostrando la no reversión en patogenicidad de la cepa China y la ausencia de efectos por parte de la vacuna marcada (82).

En un estudio realizado tendiente a evaluar las lesiones macroscópicas post-mortem para la detección de brotes de PPC en países bajos en Europa se encontró como hallazgos frecuentes a la necropsia: neumonía, pleuritis, bronquitis crónica, edema pulmonar, úlcera gástrica crónica, materia fecal seca contenida en el colon, conjuntivitis, hemorragias en pelvis renal, hemorragias renales, aumento del tamaño del bazo, hemorragias vesicales y aumento del tamaño de los ganglios linfáticos presentando estos hemorragias, siendo esta uno de las observaciones más frecuentes en la presentación de brotes de PPC. Estos hallazgos son similares a los observados en este trabajo para el grupo control "C" el cual fue desafiado (83). Por otra parte, Elber et al., (2003) encontraron que la presentación de neumonía y pleuritis pueden ser un hallazgo

frecuente en animales sanos como enfermos por virus de PPC. En general se puede afirmar que los hallazgos macroscópicos, tienen un valor significativo que contribuye a la detección de brotes de esta enfermedad, pero de igual forma dependerá del estado de la enfermedad, de la virulencia de la cepa circulante, de las complicaciones por infecciones secundarias y de la condición inmunitaria de las poblaciones al momento de la infección (83).

Cuando se analizó el **recuento leucocitario** en el presente experimento se encontró que los virus vacunales produjeron una leve reducción en el recuento de leucocitos para los grupos A y B, sin que esta condición se considere como una verdadera leucopenia, ya que los valores obtenidos durante los muestreos no salieron de los rangos normales de recuento leucocitario para la especie y edad de los animales (102).

En los estudios donde se compararon la vacuna de cepa China respecto a una vacuna marcada, se estableció para las dos vacunas que estas no produjeron leucopenia en los grupos experimentales (82). Se puede inferir que los resultados del presente experimento para los dos grupos vacunados (A y B) que los dos productos biológicos tampoco produjeron efectos adversos sobre el recuento leucocitario corroborando lo observado previamente. En contraste, para el grupo "C" se observó una reducción significativa en el recuento leucocitario en los primeros días después del desafío, el cual se podría considerar como leucopenia, demostrando de esta forma la infección viral activa y el efecto inmunosupresor de una cepa como lo es la cepa Santander. Lee et al., (1999) observaron que 3 a 5 días postinoculación se evidenció una marcada leucopenia en animales desafiados sin vacunar, hallazgo similar a lo encontrado en el grupo control "C" en el presente experimento (84).

En la **valoración de lesiones microscópicas y detección del antígeno por inmunohistoquímica (IHQ)** se encontró que para los grupos A y B no se observaron lesiones microscópicas relevantes que se puedan asociar con la infección activa del virus de PPC una vez ocurrida la vacunación y después del desafío, ni tampoco se detectó la presencia del antígeno vacunal o de desafío en tejidos evaluados por medio de la IHQ utilizando un anticuerpo monoclonal para PPC. Se debe destacar que en el grupo C se encontraron cambios histopatológicos variables pero importantes, en particular en dos animales (4C y 6C), lo cual sugirió la infección activa con el virus de PPC, similar a lo

observado por Villamil et al.,(1999) cuando utilizaron la cepa Santander como antígeno viral de desafío para la evaluación de vacunas en Colombia (62). De igual forma se detectó por IHQ la presencia y distribución del antígeno de desafío en varios tejidos en estos dos animales, incluyendo tejido linfoide. Sin embargo, el antígeno viral no se detectó en todos los animales del grupo control, ya que estos no fueron sacrificados en diferentes periodos de tiempo como se llevó a cabo con los animales vacunados, llegando estos animales al final del experimento momento en el cual posiblemente ya no era detectable el antígeno por IHQ en los tejidos, quizás producto de la respuesta por parte del sistema inmune al virus de desafío en forma temprana, lo cual se podría correlacionar con la corta viremia y la baja detección del ácido nucleico por las técnicas moleculares empleadas en la evaluación de los tejidos para estos animales. De igual forma, se debe tener en cuenta la respuesta inmunológica individual y la posible capacidad de infección del virus de desafío en cada individuo.

En conclusión, el estudio reveló la ausencia de detección del antígeno vacunal y de desafío por IHQ para los animales de los grupos vacunales, respecto a los animales del grupo control. Indirectamente se podría asumir que la protección generada por las vacunas limita la distribución del antígeno de desafío y la posibilidad de detección por IHQ (52,44,79,95).

Se podría suponer para aquellos animales a los cuales no se les detectó el antígeno por inmunohistoquímica, ni tampoco el ARN viral por RT-PCR anidada E2 en forma individual (cerdos 1C, 2C y 5C) y que eran animales que tenían niveles de anticuerpos determinados por ELISA y que estos pudieron haber limitando la distribución y replicación de antígeno viral en los tejidos, impidiendo su identificación o detección del ácido nucleico viral por estas metodologías diagnósticas, para el tiempo en que se llevó a cabo el sacrificio de estos animales (77,95).

Cuando se determinó la **presencia de anticuerpos** en los tres grupos experimentales es claro que la detección de anticuerpos post-vacunación solo aparecieron hasta 15 días posterior a la vacunación, en donde se empezó a detectar la presencia de anticuerpos por ELISA, en aquellos animales que desde el inicio del experimento no presentaron niveles de anticuerpos detectables. No obstante, la respuesta serológica fue variable entre los grupos. Por otra parte, se encontró que los animales que presentaron

anticuerpos maternos al momento de la vacunación, mostraron una leve reducción en los niveles de anticuerpos de 3 a 4 días post-vacunación pero posterior a esto, se observó un incremento de los niveles de anticuerpos asociados a la respuesta post-vacunal, al ser estos evaluados por ELISA.

Por otra parte, se encontró que para aquellos animales con anticuerpos antes de la vacunación de origen materno pudo ocurrir una interferencia y bloqueo de la actividad viral, así estos anticuerpos sean muy bajos y de poca detección por ELISA y si identificados por NPLA, así por ejemplo, el animal 5C presentó una baja viremia respecto a los animales del mismo grupo "C", en los cuales fue detectable en mayor proporción en muestras de sueros positivos por ELISA- Ag y las técnicas moleculares (44).

Existe evidencia muy clara y documentada sobre la respuesta inmune frente a las vacunas elaboradas con la cepa China, en donde se ha demostrado que la aparición de anticuerpos neutralizantes inducidos por la vacuna ocurre a las 2-3 semanas seguidos de la vacunación (Precausta et al., 1983; Terpstra et al 1990, citado por Suradhat et al., 2007) (44,61). También se ha demostrado que cerdos vacunados con las vacunas elaboradas con la cepa China presentan completa protección de forma temprana a la semana de vacunación (Van Oirschot 2003, citado por Suradhat et al., 2007) (61). Se debe señalar que la protección inducida por la vacuna se logró en ausencia de anticuerpos neutralizantes en el momento del desafío. Este hallazgo implicó un papel importante de la inmunidad celular en la protección viral durante las etapas tempranas de la respuesta inmune. (Launais et al., 1978; Rüménapf et al., 1991, citado por Suradhat et al., 2007) (44,61).

Se debe tener en cuenta que la presencia del antígeno vacunal en presencia de anticuerpos neutralizantes de posible origen materno pudieron llevar al bloqueo de la respuesta humoral y a la reducción de los niveles de anticuerpos en suero, lo cual se evidenció en los hallazgos encontrados en los cerdos 5A, 12A, 3B, 5B y 6B, para los cuales se les detectó anticuerpos antes de la vacunación y con el tiempo se evidenció una reducción en los niveles de anticuerpos durante el experimento después de la vacunación, llevándolos a ser sospechosos o negativos al ser evaluados estos por las pruebas de ELISA. No obstante, se encontraron animales que presentaron anticuerpos antes de la vacunación (3A y 1B), los cuales tuvieron un ascenso posterior en los niveles

de anticuerpos. Se debe considerar que existe una variada respuesta inmunológica en cada individuo dentro de una población. Cuando se analizó la respuesta serológica por las pruebas de ELISA se encontró entonces una respuesta serológica variable en los animales del presente estudio.

Koenig et al., (2007) en su experimento evaluando una vacuna elaborada con la cepa China y una vacuna marcada, encontraron que los animales seroconvirtieron al día 11 post-vacunación, medibles estos por una prueba comercial de ELISA (HerdCheck ® CSFV Ab) para las dos vacunas. Para el presente experimento se podría atribuir que la seroconversión y detección de anticuerpos vacunales variables por las dos pruebas de ELISA utilizados para evaluar la respuesta serológica frente a las dos vacunas utilizadas, están asociados a la posible interferencia de los anticuerpos maternos, el comportamiento biológico natural que tiene cada virus con el que se elaboran las vacunas y a la variada respuesta inmunológica que puede tener cada individuo, siendo estos criterios importantes a tenerse en cuenta en la interpretación de la serología para PPC en casos de campo (44,82).

Por otra parte, se pudo demostrar que posterior a los 15 días de vacunación para los grupos vacunales los animales no obstante al no presentar anticuerpos claramente detectables por las pruebas de ELISA mostraron una definida protección al virus de desafío, asociada esta protección a la inmunidad celular, ya que no se evidenció cuadro clínico en estos animales, ni viremia como se comprobó una vez evaluados los sueros y leucocitos por RT-PCR anidada E2 y RT-qPCR 5'UTR, algo similar a lo descrito en la literatura (58,67,91).

Tratando de examinar los resultados serológicos con los dos kits de ELISA (Prionics ® e Idexx®) se observó que para el kit Idexx se detectó un mayor número que animales positivos, los cuales por el kit de Prionics llegaron a ser sospechosos o negativos.

Por otra parte Colijn et al., (1997) al evaluar la respuesta serológica en animales desafiados experimentalmente al evaluar por dos pruebas de ELISA (Ceditest® ELISA Ab, actualmente Prionics y CTB-ELISA) y al compararlo con la prueba NPLA, establecieron que los primeros anticuerpos detectados para el grupo experimental de 19 animales aparecieron a los 14 dpi. Cuando se comparó con la NPLA y la Ceditest®

ELISA se encontró una concordancia del 95%, debido a que 8 sueros tomados a los 17 y 21 dpi, fueron negativos por NPLA pero positivos por ELISA, lo cual comprobó la alta sensibilidad de esta ELISA. No obstante dos sueros colectados al 17 dpi con resultados cuestionables por ELISA fueron positivos por NPLA. Comparando la NPLA respecto a la ELISA no se encontraron falsos negativos (67).

Además es interesante mencionar que los hallazgos de esta investigación permitieron demostrar que la viremia por el virus de PPC es corta. La **detección del antígeno vacunal o de campo por ELISA Ag** y el ARN viral por RT-PCR anidada E2 y RT-qPCR 5'UTR en sueros se encontró que para el caso de las ELISAs Ag, solo se detectó el antígeno de desafío en cuatro animales del grupo control (cerdos 1C, 2C, 4C y 6C) en sueros entre 2 y 4 días posterior al desafío (día 18-20). También se determinó que la RT-PCR anidada E2 y la RT-qPCR 5'UTR tiene una mayor capacidad de detección en relación a la detección de ácido nucleico viral, puesto que se detectaron animales del grupo "C" en forma más temprana, pero con una posible correlación con la detección por ELISA Ag, no obstante, aunque son metodologías distintas y el blanco de detección cambia (ácido nucleico vs antígeno completo). Es claro que no se detectó el virus vacunal en los dos grupos (A y B) por la ELISA- Ag y las metodologías de PCR, lo cual sugirió que la viremia es muy corta y se correlaciona con lo expuesto en estudios previos en donde se estableció que la viremia por virus vacunal con cepa China puede ser de un día (44).

Buscando establecer alguna relación con la aparición de los anticuerpos y la detección del antígeno por la ELISA-Ag para los animales del grupo control "C" se encontró que estos comenzaron a detectarse del día 26 al 30 para los animales 1C, 2C, 4C, 5C y 6C, por las dos pruebas de ELISA-Ac utilizadas, 8 días después del desafío. En relación con la viremia detectada por los kits de ELISA-Ag y las metodologías de PCR, se encontró que la aparición de anticuerpos detectables como verdaderamente positivos por ELISA-Ac, no son totalmente neutralizantes, debido a que persistió la viremia hasta el final del experimento o momento de la muerte en cada uno de estos animales del grupo control (58,67,90,104).

Se debe destacar que en los animales de los grupos "A y B" no se detectó ni el antígeno vacunal ni de campo por ELISA-Ag (de captura de antígeno) ni en las técnicas

moleculares en muestras de suero sanguíneo. Hay que tener en cuenta que en la mayoría de animales de los grupos A y B no presentaron anticuerpos detectables por ELISA a excepción de los animales 3A, 5A, 12A, 1B, 3B, 5B, 6B, 8B y 9B algunos de los cuales fueron positivos o sospechosos por ELISA para alguna de las pruebas utilizadas, pero sí positivos por NPLA, lo cual en cierta forma pudo bloquear y reducir la presencia del antígeno viral en circulación.

Para el caso de cerdo 2C solamente se detectó antígeno al día 20 con la prueba de ELISA Ag Idexx®. Para este animal los anticuerpos detectables por las dos pruebas de ELISA aparecieron al día 26 al 29, día en el cual se sacrificó el animal ya que fue un animal que no obstante a ser desafiado no presentó un posible cuadro clínico asociado a PPC. Se puede pensar que este animal no presentó una clara viremia detectable por los kits de ELISA- Ag. Para el cerdo 5C no se detectó el antígeno dentro el periodo de experimentación, pero se debe tener en cuenta que en este animal se detectaron anticuerpos de posible origen materno siendo positivo por NPLA al día uno. El relación con la viremia detectada por los kit de ELISA-Ag y las técnicas moleculares utilizadas, se encontró que el recuento leucocitario para el grupo "C" (cerdos 1C, 2C, 4C y 6C) es menor tan pronto se hace detectable el antígeno de desafío, demostrando la infección activa en estos animales y el efecto inmunosupresor del antígeno viral (58).

Examinando en general los hallazgos de las técnicas para la detección del antígeno y el ácido nucleico viral se observó que para los animales 4C y 6C se detectó el antígeno en la mayoría de los tejidos evaluados, presentándose una posible correlación con el estado de viremia, la cual fue más prolongado para estos animales, respecto al restante de los animales del grupo "C" en donde no se detectó el antígeno de desafío por IHQ en los tejidos y su estado de viremia fue más corto (79).

En cuanto a la detección del ácido nucleico de PPC por RT-PCR anidada E2 en tejidos se demostró que el ARN viral no se detectó en los diferentes animales sacrificados antes del reto en los dos grupos de animales (A y B), pero si se detectó en el cerdo 5A al 4 día después del desafío en tonsila por RT-qPCR 5'UTR, siendo este posiblemente el antígeno de desafío. Por otra parte, para el cerdo 9A al día 18 del reto fue detectado el ácido nucleico por RT-qPCR 5'UTR (Ct 35.18), lo cual posiblemente se correlacionó con la reducción del recuento de glóbulos blancos en este día para este animal.

La prueba de inmunohistoquímica (IHQ) mostró una buena similitud con la RT-PCR anidada E2, en relación a la identificación del antígeno y la detección del ácido nucleico viral en forma individual en los tejidos para los cerdos 4C y 6C (79). Para el caso de la RT-qPCR 5'UTR se encontró mayor detección del ácido nucleico viral de desafío en un mayor número de tonsilas, en comparación con la RT-PCR anidada E2, evidenciándose así una mayor capacidad de detección, lo cual se podría percibir como una mayor sensibilidad de esta prueba. De igual forma se demostró que el órgano de elección para el diagnóstico de PPC debe ser la tonsila, ya que es el sitio de permanencia de mayor tiempo del virus de PPC y en donde se tiene mayores posibilidades de detección del ácido nucleico viral, sin que esto sea un indicativo de la presencia de virus viable, ya que en los aislamientos virales realizados solamente se lograron obtener en dos animales del grupo control (4C y 6C) respecto al total de animales evaluados.

Es de tener en cuenta y de resaltar que el antígeno vacunal para el caso de las dos vacunas, no fue detectable en tejidos en forma individual y en pools de tejidos por las dos metodologías de RT-PCR utilizadas, quizás demostrando la baja capacidad de replicación y de distribución del antígeno de las dos vacunas evaluadas (Anexo N).

Oude et al., (2006) determinaron que el área oro-nasal es la principal área de replicación viral especialmente en la tonsila y ganglios submandibulares, desde donde el virus se distribuye a otros tejidos linfoides y órganos viscerales con el incremento de la viremia, por lo cual se deben considerar estos tejidos como de elección para el diagnóstico de PPC (90).

De otro lado, se demostró en este estudio que las mejor muestra a partir de sangre completa lo constituye los leucocitos, ya que se encontró una mayor detección de ácido nucleico de PPC tanto por RT-PCR anidada E2 y RT-qPCR 5'UTR en los animales del grupo control ("C") respecto a los sueros, siendo quizás esta última la de mayor sensibilidad para este tipo de muestras y otras estudiadas por esta metodología.

Analizando la excreción viral detectada por RT-PCR anidada E2 y la RT-qPCR 5'UTR, mediante pools de hisopados nasales y rectales se encontraron dos animales de los grupo A (1A y 2A) y B (2B), los cuales presentaron posible excreción del antígeno

vacunal vía rectal, lo cual no se evidenció en el restante de los animales de este grupo A y B, siendo esto una excepción puntual. Después del desafío se encontraron dos animales del grupo A (7A y 10A) que presentaron detección por RT-qPCR 5'UTR posiblemente del virus de desafío en pooled hisopados nasales. Adicionalmente en el grupo control se hizo evidente la posible excreción viral rectal en los cerdos (6C y 4C) detectado por la PCR en tiempo real, respecto a la excreción nasal la cual se evidenció en estos dos animales, más el 1C. Así mismo se encontró mayor detección por parte de la RT-qPCR 5'UTR frente a la RT-PCR anida E2. Wang, 1996; Kojnok et al., 1980, citados por Qiu, (2006) (44) concluyeron que cerdos vacunados con vacunas elaboradas con la cepa China, raras veces presentan excreción viral al medio y/o contagio a cerdos en contacto mediante excreciones, de forma similar a lo encontrado en este experimento.

Cuando se examinaron los pooled de sueros se encontró que para el caso de la RT-qPCR 5'UTR, la capacidad de detección es mayor sin afectarse la sensibilidad de esta prueba al realizar este procedimiento.

Comparando las técnicas moleculares con el aislamiento viral según lo descrito previamente (79), estas son más sensibles que el mismo aislamiento viral, algo similar a lo encontrado en este trabajo en donde se detectaron más animales positivos al analizar tejidos por las técnicas moleculares utilizadas (Tabla 6 y Anexo 16).

En general, la aplicación de la cepa China no solamente confiere protección clínica (no presentación de signos clínicos), sí no que también protección virológica (ausencia de viremia y excreción viral), ya que los cerdos vacunados no eliminan el virus de desafío a animales contacto no vacunados hasta una semana post-vacunación (Biront et al., 1987; Dahle y Liess 1995; Ferriri 1992; Dewulf 2002; Terpstra y Wensvoort 1987, citados por Qiu, 2006) (44). Pero animales vacunados con una dosis subóptima de la cepa China y desafiados, el antígeno de desafío puede ser detectado en tonsila dentro de varias semanas seguido del desafío (Leunen y Strobbe 1977, citados por Qiu, 2006) (44).

En conclusión se puede inferir con los hallazgos de la presente investigación es que las vacunas estudiadas ofrecen una buena protección, frente al desafío con una cepa de campo, con una escasa o nula excreción viral, generando una adecuada respuesta serológica y una bajo o nula distribución del antígeno vacunal en los tejidos, hallazgos

importantes que se deben tener en cuenta al momento de hacer el diagnóstico de la enfermedad en animales vacunados y criterios de selección de vacunas en programas de control y erradicación de PPC.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

En general las vacunas utilizadas en el país son altamente protectivas en animales desafiados con una cepa de campo, limitan la distribución del antígeno de campo, no reversionan en patogenicidad, el periodo de viremia es muy corto, no hay excreción del antígeno vacunal evidente y la distribución del antígeno en los tejidos es nula en los periodos de tiempo en que se tomaron las muestras, siendo esto demostrado por las diferentes metodologías diagnósticas utilizadas. De igual forma, el aislamiento viral no fue evidenciado en los animales vacunados desafiados para los periodos de tiempo muestreados, siendo esta una condición importante al momento de realizar el diagnóstico de casos sospechosos de PPC en zonas con vacunación y en posible riesgo de circulación de cepas de campo. En relación a la IHQ, es claro que esta prueba posiblemente podría detectar antígeno en tejidos sí solamente se tiene una viremia evidente como se demostró en los animales del grupo control. Respecto a la aparición de anticuerpos detectables por ELISA post-vacunación se demostró que el comportamiento es variable entre los individuos y entre poblaciones, y se relaciona con la exposición al virus de campo y/o vacunal. Estos anticuerpos totales podrían incluir anticuerpos protectivos, los cuales a pesar de que no sean claramente detectables, sí confieren protección ante un desafío con un virus de campo. Por otra parte, se evidenció una mayor sensibilidad de la RT-qPCR 5'UTR con respecto a la RT-PCR anidada E2, al detectarse el ácido nucleico viral en número mayor de muestras evaluados como lo fueron sueros, leucocitos, tejidos, hisopados nasales y rectales.

Finalmente, es importante mencionar que la cepa Santander se comportó como una cepa de moderada virulencia, ya que no generó cuadros clínicos, lesiones macro y microscópicas relevantes que llevaran a la muerte de la totalidad de los animales del grupo control, los cuales eran totalmente susceptibles y deberían fallecer en su totalidad como se espera en una prueba de potencia vacunal

5.2 Recomendaciones

- 1- Se hace necesario implementar como técnica diagnóstica base para la detección precisa y rápida de casos compatibles con PPC la RT-qPCR, ya que se demostró que es una técnica más sensible que la RT-PCR anidada E2.
- 2- Se debería pensar en la utilización de kits de ELISA para diferenciar la respuesta serológica contra pestivirus los cuales se encuentra disponibles comercialmente.
- 3- Se debe hacer confirmación de casos positivos por ELISA por NPLA para los diferentes pestivirus (DVB o BD) en caso de animales positivos pertenecientes a áreas libres.
- 4- Las autoridades sanitarias deberían tener en cuenta la posibilidad de la utilización de vacunas marcadas en aquellas zonas de protección (zonas de frontera y a riesgo), ya que a nivel diagnóstico permite inferir de forma rápida la presentación de anticuerpos vacunales o por infección por virus de campo cuando se utilizan pruebas de ELISA diseñados para este fin.
- 5- En casos de brotes de PPC, la vacunación con vacunas elaboradas con la cepa China provee una buena protección en animales susceptibles y limita la excreción viral en animales enfermos por PPC, siendo esto una herramienta de importancia para limitar la propagación de la enfermedad en casos de problemas epidémicos.
- 6- Es importante concientizar a la población en general de la importancia de la notificación de casos sospechosos de PPC a las autoridades sanitarias, con el objeto de hacer el diagnóstico de forma oportuna, de una forma adecuada y

generando acciones que limiten la presentación de brotes de PPC en zonas libres ó con vacunación.

- 7- Se recomienda a las autoridades de control de producción de biológicos la utilización de cepas de desafío con un mayor grado de patogenicidad al momento de realizar la evaluación de las vacunas en nuestro medio o países con problemas endémicos.
- 8- Relacionado con los hallazgos de la presente investigación sería conveniente ajustar los protocolos de evaluación de las vacunas en Colombia considerando evaluar la presencia de anticuerpos antes del desafío por medio de pruebas de ELISA para PPC y otras enfermedades que generan inmunocompromiso (PRRS, Circovirus Porcino). De igual forma evaluar la titulación de las vacunas, la carga viral por RT-qPCR y su efecto biológico mediante el establecimiento de viremia antes y después del desafío por técnicas de PCR. Así mismo, sería importante determinar la presencia de contaminantes en las vacunas como son virus de DVB, PCV2, *Mycoplasma spp.*, entre otros, debido que el protocolo actual solo considera contaminación bacteriana y pruebas de potencia.
- 9- Finalmente, se sugiere revisar y ajustar periódicamente las metodologías de diagnóstico para PPC, evaluando la sensibilidad y especificidad de las pruebas diagnósticas, evaluando los analistas y participando en pruebas interlaboratorio que permitan conocer la calidad de los procedimientos diagnósticos.

GUÍA DE USO ESTRATÉGICO EN LA UTILIZACIÓN DE LOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO PARA PPC

- 1- La muestra ideal para el diagnóstico de PPC en animales que fallecen lo constituyen tonsila principalmente sin dejar de lado tejido linfoide como lo es bazo y ganglios linfáticos.
- 2- La muestra de sangre ideal a partir de animales vivos para el diagnóstico de PPC lo constituye sangre entera con EDTA, lo cual garantiza la extracción de glóbulos blancos para la realización de técnicas moleculares y su posible utilización en la realización de aislamiento viral.
- 3- Se debe tener en cuenta que en zonas con vacunación los cerdos menores a dos meses de edad no vacunados contra PPC, la posibilidad de la detección de anticuerpos de origen materno por las técnicas de ELISA es alta. Esto se debe tener en cuenta al momento de realizar la interpretación de los resultados de ELISA con base en la historia clínica.
- 4- Se debe tener en cuenta que la aparición de anticuerpos post-vacunales está entre 15 y 22 días en animales vacunados a los 50 -56 días de edad, lo cual se debe tener en cuenta en aquellas zonas con vacunación.
- 5- En zonas sin vacunación la detección de anticuerpos por ELISA o NPLA pueden estar atribuidos a infección de campo por virus de PPC o DVB (Diarrea Viral Bovina), por consiguiente, se debe realizar diagnóstico diferencial para estas entidades.
- 6- Resultados positivos por ELISA pero negativos por NPLA, no obstante a que es la prueba de oro serológica, no es garantía de que en verdad un animal no tenga anticuerpos frente a PPC, ya que las pruebas de ELISA pueden llegar a ser más sensibles que la NPLA como está citado en la literatura. Por lo anterior, se hace necesario realizar chequeos serológicos pareados y poblacionales, en casos en donde las pruebas serológicas se utilizan como herramientas diagnósticas en la

atención de notificaciones de casos sospechosos de PPC y en muestreos realizados para vigilancia activa.

- 7- Para la confirmación de casos de PPC se hace indispensable la secuenciación para poder hacer la diferenciación entre cepas vacunales y de campo.
- 8- Se hace necesario y fundamental hacer el aislamiento viral para confirmar casos y muestras positivas a partir de técnicas moleculares, tendiente esto a la obtención de cepas de campo para su posterior caracterización biológica y genotipificación.
- 9- El diagnóstico de necropsia, histopatológico son herramientas que orientan los casos sospechosos de PPC, por lo que es importante el envío de pools de tejidos los cuales deben incluir: encéfalo, tonsila, ganglios linfáticos, bazo, intestino (válvula ileocecal), riñón y pulmón.
- 10- La inmunohistoquímica (IHQ), es una buena técnica que permite realizar el diagnóstico en casos de campo de PPC, a partir de muestras fijadas en formol y en las cuales por histopatología convencional (H-E) presentan lesiones compatibles con PPC.
- 11- Se debe tener en cuenta las siguientes consideraciones para la toma y envío de muestras al laboratorio:
 - Para muestras colectadas destinadas a el diagnóstico molecular y aislamiento viral se deben enviar tejidos como lo son: tonsila, ganglios linfáticos y bazo principalmente, en bolsas Nasco o recipientes plásticos limpios y nuevos. Estos deben permanecer y ser enviados refrigerados a 4°C, hasta su llegada al laboratorio para su respectivo análisis.
 - Las muestras tomadas de animales vivos como lo constituyen la sangre tomada con EDTA para la recuperación de glóbulos blancos, se debe considerar tomar como mínimo 5 ml de sangre evitando su hemólisis, homogenizando la muestra rotando el tubo varias veces (5 a 10 veces) para garantizar el efecto del EDTA. Se deben refrigerar y enviar a 4°C al laboratorio, mas nunca congelar.

- Las muestras para diagnóstico histopatológico y la inmunohistoquímica (IHQ) deben de ser muestras tomadas en formalina tamponada al 10% tomando fragmentos de tejido no mayores a 1 cm³ (encéfalo, tonsila, ganglios linfáticos, bazo, pulmón, riñón, hígado e intestino – íleon) los cuales se deben enviar en recipientes plásticos, de boca ancha, en una proporción de 1 parte de tejido por 3 de formol (1:3). Por ningún motivo se debe refrigerar y se deben enviar separadas de las muestras refrigeradas.

- Para el diagnóstico de casos sospechosos de PPC se hace necesario hacer un análisis de la historia clínica, los resultados de laboratorio y la condición cambiante en el tiempo en el campo desde el momento de la notificación hasta la obtención de los resultados de laboratorio.

A. Anexo: Protocolo verificación de calidad de la vacuna de peste porcina clásica utilizado por el laboratorio de insumos pecuarios LANIP-ICA

1. Los cerdos provenientes de granjas libre de PRRS y PPC, igualmente una vez en las instalaciones del Laboratorio Nacional de Insumos Pecuarios se toma las muestras de suero para verificar que no presentan anticuerpos por ELISA para estas enfermedades antes de la prueba. Se utilizan animales entre los 55-60 días de edad.
2. El día 1 corresponde a la vacunación y prueba de inocuidad. Se utiliza 5 cerdos por lote para vacunar, un grupo de 5 cerdos como control y 2 para inocuidad por lote. Este día se marcan los animales y se vacunan con la dosis especificada por el laboratorio productor, por vía intramuscular en la tabla del cuello. Los controles no se vacunan y los de inocuidad reciben 10 veces la dosis de los vacunados. Esta se coloca intramuscular en ambas tablas de cuello 10 ml en cada una.
3. Durante los 14 días siguientes se toma la temperatura de los animales. Los de inocuidad la temperatura no debe superar 0.5°C .
4. El día de la descarga con la cepa Santander, se realizan las diluciones del virus que tiene un título de 7:8. La descarga se realiza de acuerdo a lo estipulado en el manual de la OIE, con 10^5 PID50%, vía intramuscular en la tabla del cuello, 1 ml por animal. De esta forma se desafían tanto los animales vacunados como los controles. Los cerdos de inocuidad no son desafiados y salen de la prueba en este momento. Se toman temperaturas diarias a los vacunados y a los controles las cuales son registradas. El virus está previamente titulado.
5. Más o menos a los 5 – 7 días los controles presentan signos de enfermedad y se toman las respectivas muestras.
6. A los 14 días post-descarga se realiza la lectura. Por lo menos el 80% de los controles deben morir y por lo menos el 80 % de los vacunados deben sobrevivir.
7. De igual forma se realiza la prueba de esterilidad en medio líquido, tripticasa de soya a 22°C y 34°C , en el cual no debe crecer ningún microorganismo.

B. Anexo: Procedimiento para la realización de la inmunohistoquímica (IHQ) para la detección del antígeno de PPC

Objetivo

Esta prueba provee una detección cualitativa del virus de Peste Porcina Clásica en tejidos fijados en formalina y embebidos en parafina, utilizando un anticuerpo monoclonal dirigido a la proteína E2 del virus de Peste Porcina Clásica.

Reactivos

Anticuerpo primario policlonal: anti-PPC de ratón. Producido por Bio-X Diagnostic de Bélgica.

Sistema de detección: EnVision +/HRP IgG anti-ratón de Cabra. Dako-Cytomation; HRP-labeled polymer conjugate

Cromógeno: 3-amino-9-etilcarbazole. Dako-Cytomation; listo para usar

Otros reactivos: disolvente alcohol a diferentes grados; TBS 0.05M, pH 7.6; Tween 20; Proteinasas K; peróxido de hidrogeno 3%; hematoxilina de Meyer, medio de montaje acuoso.

Procedimiento

Tratamiento de las láminas

Limpiar bien cada lámina

Sumergirlas en alcohol ácido 15 minutos

Limpiar y secar bien las laminas

Sumergir en acetona por 15 minutos

Secar bien

Sumergir en L-Polilisina preparada 1:10 por 20 minutos

Ej. De preparación de la L-Polilisina. 100 ml de Polilisina+ 900 ml de H₂O destilada (1:10)

Tratamiento de las láminas con los cortes histológicos

Cortes histológicos a tres micras, tomados de baño flotación conteniendo agua destilada a una temperatura de 40°C.

Desparafinar los tejidos a 56 o 60°C por una hora o toda la noche o 80°C por una hora (Considerar el punto de fusión de la parafina utilizada)

Desparafinar las laminas a través de 3 pasos por xilol (3 min c/u)
Rehidratar los tejidos en alcoholes descendentes 100% x 2, 95%, 70%, 50% y lavar con agua destilada, (3 min c/u).
Lavar con TBST (Tween) x 2 minutos.
Bloqueo endógeno de la peroxidasa con H₂O₂ al 3% por 10 min.

Ej. De Preparación de 200 ml de H₂O₂ al 3%.

$$V_i * C_i = V_f * C_f$$
$$? 30\% = 200\text{ml} * 3\%$$
$$200\text{ml} * 3\%$$
$$\text{-----} = 20 \text{ ml de H}_2\text{O}_2$$
$$30 \% \text{ H}_2\text{O}_2$$

Tomo 20 ml de H₂O₂ y adiciono 180 ml de Etanol

Lavar tres veces con TBST

Desenmascarar el antígeno por la digestión con proteinasa K al 0.001% (diluida en TBST) por 2 min a T° ambiente. Se debe colocar 200 ul por lámina cubriendo el tejido

Ej. De preparación de de proteinasa K para 5 láminas

$$V_i * C_i = V_f * C_f$$
$$? 10\text{mg/ml} = 1000 \text{ ul} * 0.1 \text{ mg/ml} (0.01\%)$$
$$1000 \text{ ul} * 0.01 \text{ mg/ml} (0.001\%)$$
$$\text{-----} = 1 \text{ ul de proteasa}$$
$$10 \text{ mg/ml} (1\%) \text{ proteasa}$$

Tomo 1 ul proteasa y adiciono 999 ul de TBST y aplico vortex

Lavar en TBS/Tween por 2 minutos

Aplicar 200 ul (3-4 gotas) por lámina sobre el tejido de anti-PPC. Recomendación de uso 1:200 (IHQ).

Ej. De preparación para 5 láminas

Tomo 1000 ul de TBST retiro 50 ul y adiciono 50 ul de anti- PPC de ratón, quedando a una dilución de 1:20. Aplico Vortex

Incubar por 1 hora en cámara húmeda

Lavar en TBS/Tween por 2 minutos

Aplicar anticuerpo secundario 200 ul (3-4 gotas) (DAKO LSAB 2, LINK - IgG anti-raton de Cabra- marcado con biotina) por 10 minutos

Lavar en TBS/Tween por 2 minutos

Aplicar conjugado (streptavidin -HRP) 200 ul (3-4 gotas) (DAKO LSAB 2, LABEL) por 10 minutos

Lavar en TBS/Tween por 2 minutos

Aplicar sustrato cromógeno DAKO AEC (3 amino-9 etilcarbazoles) 200 ml (3-4 gotas) por 5 minutos

Lavar en TBS/Tween por 2 minutos

Contrastar con hematoxilina de Meyer por 5 minutos

Lavar en agua de la llave hasta retirar el colorante

Pasar por agua amoniacal (5-10 segundos)

Pasar a H₂O y conservar hasta el montaje

Realizar montaje de las laminas con medio acuso

Interpretación

Las células marcadas con el anti-PPC muestran un patrón de tinción en el citoplasma y núcleo celular de color pardo rojizo

Se debe usar como control positivo un caso conocido positivo a PPC

Preparación de láminas con L-Polilisina

Limpiar bien las láminas.

Sumergirlas en alcohol ácido al 1% (alcohol del 70% y HCL al 1%) 15 minutos

Ej. Preparación de 100 ml de solución trabajo

70 ml de Alcohol del 100% + 30 ml de H₂O

1ml de HCL concentrado para los 100 ml

Limpiarlas y secar bien (en estufa o ventilador)

Sumergirlas en acetona por 15 minutos

Secar las láminas al ambiente

Sumergir en L-polilisina prepara 1:10 por 20 minutos

Ej. 100 ml de L-Polilisina + 900 ml de H₂O destilada.

Guardar en refrigeración en recipiente plástico.

Preparación de 1000 ml (1L) de TBS-Tween pH 7.6

Pesar 6.06 gramos de Trizma Base

Pesar 17.5 gramos de NaCl

Disolver en 800 ml de H₂O destilada

Ajustar el pH a 7.6 con HCL o NaOH con concentración molar conocida (1N).

Ajustar el volumen a 800 ml.

Adicionar 0.5 ml de Tween 20

Completar a 1000 ml (1L) con agua destilada.

Guardar en refrigeración hasta su uso (máximo 1 mes).

Nota: El TBS se puede preparar a partir del producto comercial denominado Phosphate Buffered Saline, pH 7.4 SIGMA Ref. P3813-10PAK – 115K8211

Preparación del agua amoniacal

100 de H₂O destilada + 2 ml de hidróxido de amonio al 28%

Conservación de proteinasa K y Anticuerpo de PPC

Conservar a -70°C

Materiales y reactivos

Anticuerpo monoclonal anti E2 PPC producido en ratón.

Proteinasa K marca promega -Catalogo # V3021

Cloruro de Sodio Marca MERK

Tris Base Marca SIGMA

Tween 20 MPbiomedical. Catálogo 103168

Peróxido de hidrógeno Marca MERK al 3%

Hematoxilina de Meyer

Sistema de detección EnVision +/HRP IgG anti-conejo de Cabra. Dako-Cytomation; HRP-labeled polymer conjugate Ref.K0690)

Cromógeno 3-amino-9-etilcarbazole. Dako-Cytomation (Ref.K3469)

Hidróxido de amonio al 28% Marca Fisher

Etanol Marca MERK (Etanol absoluto para análisis)

Medio de montaje Marca Dako. Ref: 53025

HCl

NaOH o KOH

L-Polilisina

Acetona Marca Merck

Agua destilada

Xilol

Materiales

Pipetas de 1000 y 2-10 μ l

Pipetas Pasteur

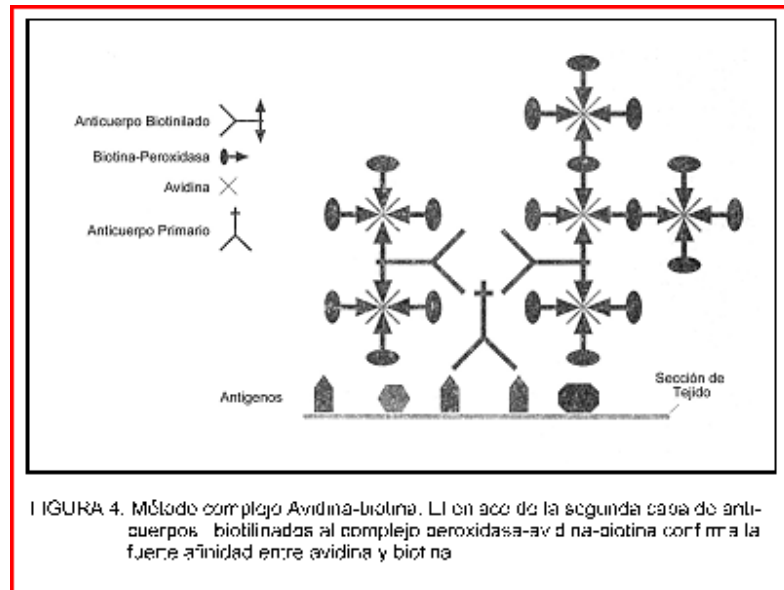
Probetas de 1000 y 25 ml

Falcon N°15 ml

Explicación del complejo de reacción biotina – avidina

El complejo ABC se basa en la gran afinidad que existe entre la vitamina-B (biotina) con la glicoproteína de huevo blanco (avidina). El antígeno de los tejidos se une con un anticuerpo primario, dirigido contra el anticuerpo en estudio y preparado en ratón o conejo, seguido por un anticuerpo secundario marcado con biotina. El anticuerpo biotinilado es entonces detectado por la aplicación de complejos de avidina a la biotina. Cada avidina tiene sitios de unión para cuatro moléculas de biotina y el complejo es generado con sitios de unión de biotina libres que facilitan la unión de los complejos al anticuerpo biotinilado. Las moléculas de biotina son marcadas con enzimas usualmente de peroxidasa, generando grandes cantidades de señales de visión por molécula de antígeno, aumentando en 1000 veces la sensibilidad a pequeñas cantidades del antígeno comparado con el método indirecto.¹ (Figura 4).

¹ RAMOS-VARA, J.; SEGALES, J.; DURAN, C.; et al. 1997. Op. Cit. Pág. 87, 89, 90.



C. Anexo: Procedimiento para la realización de la RT-PCR anidada E2 para la detección del ácido nucleico de PPC

Se debe preparar las soluciones que se indican en la siguiente tabla (tener en cuenta el número de muestras, control positivo, control negativo y control positivo de extracción).

Primers

- Primer E2A: 5` AGR CCA GAC TGG TGG CCN TAY GA 3`
- Primer E2B: 5` TCR WCA ACC AAY GAG ATA GGG 3`
- Primer E2C: 5` AGR CCA GAC TGG TGG CCN TAY GA 3`
- Primer E2D: 5` CAC AGY CCR AAY CCR AAG TCA TC 3`

- Go Taq Flexi
- RNAsin o RNAout 40U/uL
- Transcriptasa Reversa MMLV
- Controles Positivos y de Extracción (Alfort/187)
- Kit de Purificación: kit MagMAX-96 Viral Isolation Kit AMB1836-5 Ambion
- Kit de Extracción: RNeasy 74104 (50Rx) o 74106 (250Rx) de Qiagen

Transcripción reversa

Reactivo	Marca o Nombre	Concentración inicial	Vol x 1 Rx (ul)	Concentración final
Hexámeros	Promega/Invitrogen	7,5 ng/ul	5	1.87ng/ul
RNA	NA	NA	5	NA

Perfil Térmico

Número de Ciclos	Temperatura °C	Tiempo Min:Seg
1	75	3
1	4-8	∞

Se colocaron los tubos en un bloque de enfriamiento para adicionar 10 µl de la siguiente mezcla:

Reactivo	Marca o Nombre	Concentración inicial	Vol x 1 Rx (ul)	Concentración final
Agua	Libre de Nucleasas	NA	4	NA
Buffer 5X	Promega/Invitrogen	5X	4	1x
dNTPs	Promega/Invitrogen	10mM	1	0,5mM
Inhibidor	Promega/Invitrogen	40U/ul	0,5	1U/ul
MMLV	Promega/Invitrogen	200U	0,5	5U/ul
Volumen Final			20	

Perfil Térmico

Número de Ciclos	Temperatura °C	Tiempo Min:Seg
1	37	30
1	94	3
1	15	7
1	4-8	∞

Premezclas para PCR 1

Reactivo	Concentración inicial	Vol x 1 Rx (µl)	Concentración final
Agua	NA	28	NA
Buffer	5X	10	1X
MgCl ₂	25mM	2	1mM
dNTPs	10mM	1	0,2mM
Primer E2A	20µM	1,9	0,75µM
Primer E2B	20µM	1,9	0,75µM
Enzima	5 U/µL	0,3	0,03U/µl
cDNA	NA	5	NA
Volumen Final		50	

Perfil Térmico

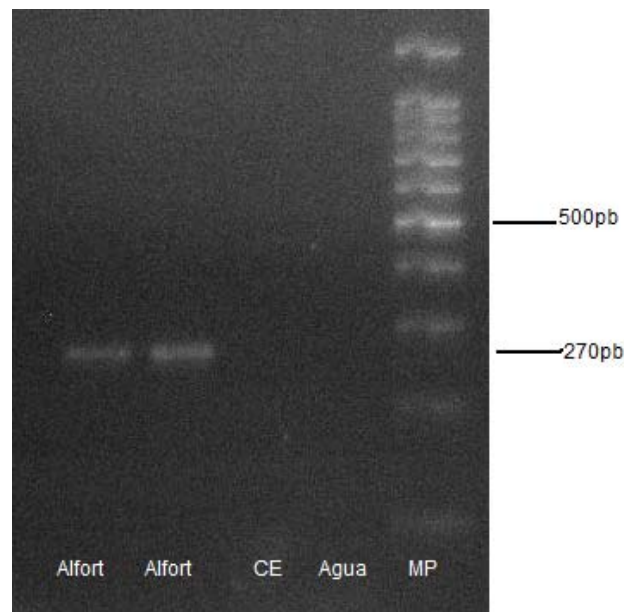
Número de Ciclos	Temperatura °C	Tiempo Min:Seg
1	94	5
20	94	00:30
	61	00:30
	72	00:30
1	72	10
1	4-8	∞

Premezclas para PCR 2

Reactivo	Concentración inicial	Vol x 1 Rx (µl)	Concentración final
Agua	NA	30,0	NA
Buffer	5X	10	1X
MgCl ₂	25mM	3	1,5mM
dNTPs	10mM	1	0,2mM
Primer E2C	20µM	1,9	0,75µM
Primer E2D	20µM	1,9	0,75µM
Enzima	5 U/µL	0,3	0,03U/µl
Producto PCR 1	NA	2	NA
Volumen Final		50	

Perfil térmico

Número de Ciclos	Temperatura °C	Tiempo Min:Seg
1	94	5
30	94	00:30
	53	00:30
	72	00:30
1	72	10
1	4-8	∞

RESULTADOS Y ANALISIS

Ejemplo de un gel de agarosa con los productos de la RT- PCR de E2 de PPC .

Interpretación de los resultados

El tamaño de banda esperado de la PCR externa es de 420pb. El producto de amplificación de la PCR Interna es de 273 pb.

Reporte de resultados

Positivo se reporta de la siguiente manera:

- Se detecto RNA de Peste Porcina Clásica.

Negativo se reporta de la siguiente manera:

- No se detecto RNA de Peste Porcina Clásica.

Referencia: Paton DJ, McGoldrick A, Greiser-Wilke I, Parchariyanon S, Song JY, Liou PP, Stadejek T, Lowings JP, Bjorklund H, Belak S. (2000). "Genetic typing of classical swine fever virus". Vet Microbiol 73:137-157.

D. Anexo: Procedimiento para la realización de la RT-qPCR 5'UTR Para la detección del ácido nucleico de PPC

1) Realizar la extracción de ARN de la muestra y de los controles de extracción, siguiendo el instructivo de extracción según el tipo de muestra y kit elegido. 2) Preparación de mezclas maestras para la RT-qPCR en Tiempo Real.

Primers y sondas

- Primer CSF145: 5'- GAG CTC CCT GGG TGG TCT AAG T-3'

- Primer CSF747 R: 5'- CAT GCC CTC GTC CAC RTA GC-3'

- Sonda CSFV A: FAM 5'ACGTCGAACTACTGACGACTGTCCTGTA CTCA 3'BHQ1

- Kit para extracción: MagMAX-96 AI/ND Viral Isolation AM1835, PureLink Micro-to-Midi Invitrogen 12183-018 y RNeasy 74106 o 74104 Qiagen

- Kit para amplificación One Step RT-PCR Kit Qiagen

- Controles Positivos y de Extracción Cepa Alfort 187

- Agua libre de RNAsas y DNAsas

- Siguiendo el procedimiento para la preparación de mezclas maestras, preparar las soluciones que se indican en la siguiente tabla (tener en cuenta el número de muestras, control positivo, control negativo y control positivo de extracción).

- Premezcla de la PCR en tiempo real para la detección del virus de Peste Porcina Clásica.

- Perfil térmico de la RT-qPCR para la detección del Virus de Peste Porcina Clásica

PERFIL TERMICO		
No. Ciclos	°C	Tiempo
1	50	30 min
1	95	15 min
40	95	15 seg
	62*	6 seg*
	72	20 seg

CAPTURA

*Captura de Fluorescencia

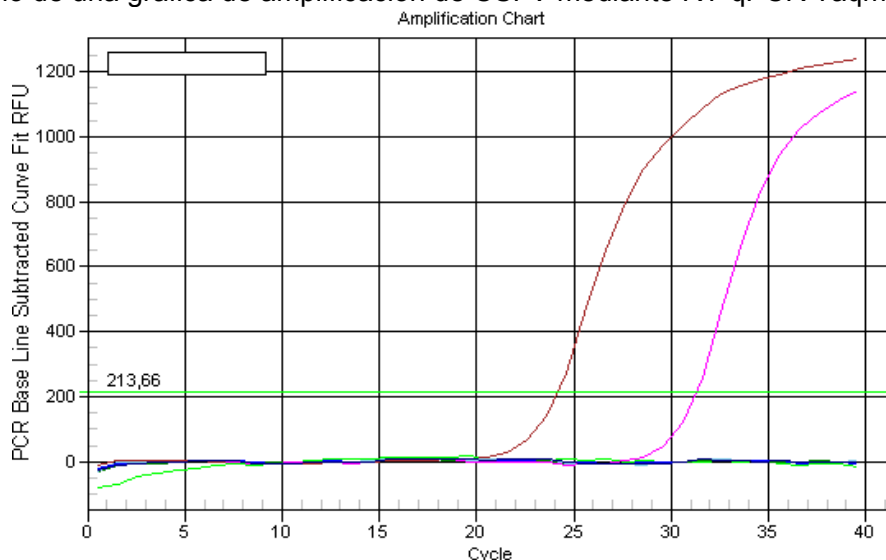
RESULTADOS Y ANALISIS

Para las muestras que son positivas se espera una curva parabólica que tenga un Ct menor a 40.

Tener en cuenta los siguientes criterios de aceptación de las corridas:

- El control negativo AGUA no debe tener valor de Ct
- En control de extracción AGUA no debe tener valor de Ct
- En control positivo de RT-qPCR diluido debe tener un valor de Ct menor a 30.
- El control positivo de extracción debe tener un valor de Ct menor a 40.

- Ejemplo de una gráfica de amplificación de CSFV mediante RT-qPCR Taqman.



La sonda debe monitorearse haciendo un análisis bajo **Background subtracted**, con el fin de evaluar el grado de degradación que está presente.

En caso de que haya duda de alguna de las curvas, se debe mirar cada pozo independientemente bajo **Background subtracted** para identificar si la muestra del pozo bajo el cual se tiene duda, tiene un comportamiento parabólico o no, en comparación con la emisión basal de fluorescencia.

Reporte de Resultados

Positivo se reporta de la siguiente manera:

- Se detecto RNA del virus del Peste Porcina Clásica.

Negativo se reporta de la siguiente manera:

- No se detecto RNA del virus del Peste Porcina Clásica.
-

Referencia: Liu L., Widén F., Baule C., Belák S. (2007). " A one-step, gel-based RT-PCR assay with comparable performance to real-time RT-PCR for detection of classical swine fever virus ". *Journal of Virological Methods* 139: 203–207.

E. Anexo: Interpretación de los resultados en el aislamiento viral de PPC

Para verificar y aprobar cada montaje realizado de la prueba de aislamiento del virus de Peste Porcina Clásica, se deben analizar previamente los resultados de los controles internos de la prueba en cada placa:

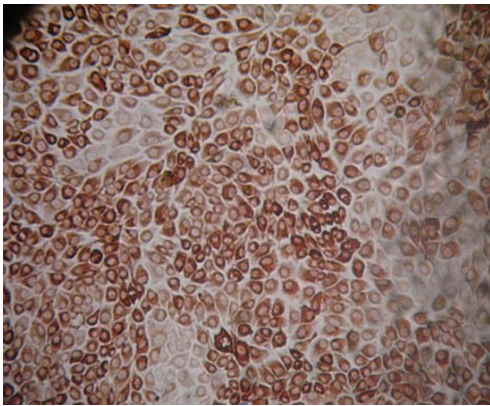
- **Control positivo:** Como control positivo, se inoculan las células con la cepa de referencia del virus de PPC Alfort-187 y/o con un tejido positivo proveniente de cerdos que han sido previamente vacunados y desafiados con el virus. En todos los pozos se debe observar el citoplasma de las células de color rojo marrón, lo cual indica que hubo replicación viral.
- **Control negativo:** Como control negativo, se emplea un tejido porcino el cual previamente ya haya dado un resultado negativo para aislamiento. Este tejido, es procesado de la misma manera que las muestras para el aislamiento del virus de PPC. Al hacer el revelado no se debe observar replicación viral.
- **Control celular:** Se usan cultivos celulares no inoculados para control y comparación con cualquier cambio morfológico observado en los pozos inoculados con muestras, adicionalmente, se emplea para verificar viabilidad celular y ausencia de contaminación microbiana o contaminación con el virus de PPC de las células. No se debe observar ningún tipo de tinción o alteración morfológica que indique replicación viral.

Después del revelado todos los controles deben cumplir con los parámetros anteriormente descritos y no se debe observar citotoxicidad. De lo contrario, el aislamiento debe repetirse.

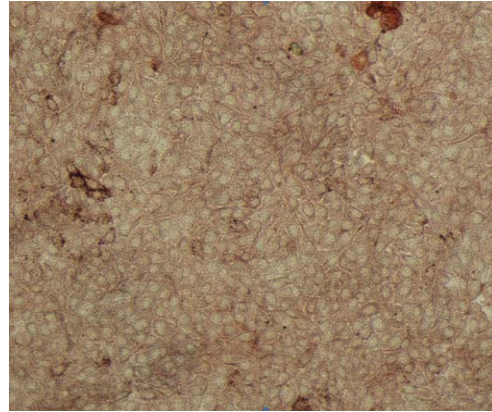
Lectura

- Un aislamiento negativo se evidencia por ausencia de color marrón en los pozos al observar bajo microscopio invertido; por el contrario, si se observa el citoplasma de las células de color rojo marrón, igual o más intenso que los pozos pertenecientes a controles del virus el resultado será positivo.

- Si al revelar la placa correspondiente a primer pase, la muestra da positiva, la placa que se encuentra congelada debe emplearse para obtener una mayor producción viral y realizarse pruebas específicas hasta su secuenciamiento.
- Si por el contrario la muestra da negativa, se utiliza la muestra de la placa que se encuentra en congelación y a partir de ésta se debe realizar nuevamente otras placas de 24 pozos como segundo pase. Es necesario hacer 3 pases en cultivos celulares, antes de determinar una muestra como negativa.



a)



b)

Figura. Técnica de Aislamiento del virus de PPC en cultivo celular. a) Resultado de una muestra positiva y b) Resultado de una muestra negativa vista, vistas bajo microscopio invertido.

G. Anexo: Valoración de la condición clínica de los animales al momento del sacrificio

Animal	Grupo	Fiebre	Debilidad y apatía	No consumo de alimento y agua	Cuadro neurológico	Conjuntivitis	Diarrea	Postración	Tos y problemas respiratorios	Hemorragias en la piel	Cianosis de la orejas	Fibrina en la heces	Materia fecal seca	Muerte del animal
1	A	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
2	A	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
3	A	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
4	A	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
5	A	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2
6	A	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
7	A	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
8	A	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
9	A	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
10	A	1	2	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2
11	A	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
12	A	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
1	B	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
2	B	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
3	B	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
4	B	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2
5	B	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
6	B	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
7	B	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
8	B	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
9	B	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
10	B	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
11	B	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
12	B	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
1	C	2	1	1	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2
2	C	2	1	1	2	1	1	1	2	2	2	2	2	2
3	C	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
4	C	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	2	2
5	C	2	1	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2
6	C	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1
Modelo estadístico de frecuencia para signos clínicos														
The FREQ Procedura	Grupo A-B-C	Fiebre	Debilidad y apatía	No consumo de alimento y agua	Cuadro neurológico	Conjuntivitis	Diarrea	Postración	Tos y problemas respiratorios	Hemorragias en la piel	Cianosis de la orejas	Fibrina en la heces	Materia fecal seca	Muerte del animal
p		0,0974	0,0001	0,0001	0,0245	0,0001	0,0003	0,0037	0,4278	0,1862	0,0293	0	0	0,1862
<0,05	Sí hay diferencias significativas entre los grupos													
>0,05	No hay diferencias significativas entre los grupos													
Condición			Denominador											
Presencia de signos clínicos			1											
Sin signos clínicos			2											

H. Anexo: Recuento de los glóbulos blancos en los diferentes momentos donde se tomaron muestras de los diferentes grupos experimentales

Animal	Grupo	1 día	2 día	4 día	6 día	8 día	10 día	12 día	15 día	16 día	18 día	20 día	22 día	24 día	26 día	29 día	30 día	
2	A	12000	11800	12550	12750					RETO								
9	B	13000	12950	11900	6650													
3	C	19500	19500	12850	11550													
3	A	16450	16700	18250	14450	13800												
1	B	19500	8100	10400	12150	10500												
1	A	19750	19500	11150	12950	14000	13800											
10	B	11250	10850	10350	2900	8200	5500											
8	A	13000	12300	15450	10650	10250	9200	8250										
4	B	10750	11650	18000	11450	16650	7800	21300										
6	A	9500	9300	10150	11550	18450	13000	14300	12100									
5	B	10750	10150	12950	8750	19700	9850	17900	18750									
5	A	4450	2800	15450	10000	13500	13700	14650	15000		10500	9000	7800					
6	B	8500	8000	9650	11200	12300	12600	15000	14750		15850	11900	13650					
7	A	16450	16300	9500	9450	9900	13100	18450	15450		15500	9050	16650	16050				
11	B	5700	5600	13650	10050	10800	9700	14950	17050		20600	8450	8800	17750				
12	A	6500	5750	8600	7950	8950	8950	13500	10100		10550	12850	12750	10150	14150			
12	B	6250	5900	12400	7750	7850	6900	12250	9400	11100	17550	11250	8100	10450				
9	A	16000	15700	12800	10600	24850	16100	20450	15050	12050	6950	15500	19400	15850	15800			
8	B	11500	11350	7550	7750	15300	9200	13000	15050	11900	14150	15000	12350	17450	21000			
10	A	8000	7300	11650	10350	8450	8400	12800	12300	9550	9800	4850	8200	12450	12700	18200		
7	B	7550	12050	12000	8950	10450	13650	14150	17500	10600	12350	11600	8850	13000	15950	18350		
4	A	6300	6200	23450	10250	17100	13200	15500	14750	10650	8550	12000	13400	11400	17100	17750	18800	
2	B	12000	11600	7950	12100	12150	8550	12600	15400	13950	10950	12200	7900	10200	13850	14350	21650	
11	A	15900	15600	17800	13600	13500	12550	14700	12050	11150	9600	12450	12800	13050	13750	16300	12350	
3	B	11000	10350	9650	21000	15350	11700	17000	17150	18150	21100	17250	15400	18100	17800	22550	11850	
6	C	17650	17650	21850	19550	12350	24300	21000	21900	13700	10550	7800	5950	9100	9550			
2	C	22200	22200	13950	14850	10650	8350	13600	10200	15850	5400	6850	7150	11250	13000	21550		
4	C	12250	12250	21950	10950	11600	9250	13300	19400	11450	4150	5500	8100	9050	8350	12100	12700	
1	C	20900	20900	17100	10850	15450	11450	8800	15150	17250	9250	4300	2950	280	4250	10100	16750	
5	C	9700	9700	8700	4550	10500	11550	17200	11700	12400	7600	9850	6250	13100	15300	15900	12200	
Modelo estadístico paramétrico ANOVA - Recuento de Glóbulos Blancos																		
Modelo Estadístico	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16		
ANOVA	0,0071	0,0342	0,0275	0,5746	0,041	0,1976	0,8538	0,5807	0,2657	0,004	0,1912	0,0197	0,0327	0,0315	0,0042	0,9094		
$p (<0,05)$	Sí hay diferencias significativas entre los grupos																	
$p (>0,05)$	No hay diferencias significativas entre los grupos																	

K. Anexo: Detección del antígeno viral por la la técnica de Inmunohistoquímica - (IHQ)

Animal	Grupo	Riñón	Pulmón	G.Linfático Pulmonar	G.Linfático Inglinal	Tonsila	Corneta	G.Linfático Submandibular	Bazo	Membrana Nictitante	Médula Ósea	Intestino	G.Linfático Mesentéricos	Hígado	Cerebro	Piel
1	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	C	2	0	1	0	2	2	0	1	2	2	3	1	1	1	1
5	C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	C	1	2	1	1	2	2	2	2	2	2	3	2	1	2	2
Condición	Denominador	Interpretación														
Sin inmunomarcación	0	No hay marcación de la muestra analizada – Negativo a Peste Porcina Clásica														
Inmunomarcación escasa	1	Hay marcación de un bajo número de células (5-20) por campo de 100X – PPC														
Inmunomarcación moderada	2	Hay marcación de un moderado número de células (20-50) por campo de 100X – Positivo a PPC														
Inmunomarcación marcada	3	Hay marcación en su mayoría del componente celular del tejido por campo de 100X – Positivo a PPC														

M. Anexo: Detección de antígeno de PPC mediante la utilización de pruebas comerciales de ELISA-Ag

ELISA Ag→		Día 1		Día 16		Día 18		Día 20		Día 22		Día 24		Día 26		Día 29		Día 30	
		Muestreo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8		Muestreo 9		Muestreo 10		Muestreo 11		Muestreo 12		Muestreo 13		Muestreo 14		Muestreo 15		Muestreo 16	
Animal	Grupo	Prionics	Idexx	Prionics	Idexx	Prionics	Idexx	Prionics	Idexx	Prionics	Idexx	Prionics	Idexx	Prionics	Idexx	Prionics	Idexx	Prionics	Idexx
2	A	0	0	RETO															
9	B	0	0																
3	A	0	0																
1	B	0	0																
1	A	0	0																
10	B	0	0																
8	A	0	0																
4	B	0	0																
6	A	0	0																
5	B	0	0																
5	A	0	0	0	0	0	0	0	0										
6	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0									
7	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0								
11	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0								
12	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
12	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
9	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
8	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
10	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
7	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
4	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	C	0	0																
6	C	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
2	C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
4	C	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
1	C	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
5	C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A	Consolidado por Grupo	0 de 96	0 de 96	0 de 7	0 de 7	0 de 7	0 de 7	0 de 7	0 de 7	0 de 6	0 de 6	0 de 5	0 de 5	0 de 4	0 de 4	0 de 3	0 de 3	0 de 2	0 de 2
B		0 de 96	0 de 96	0 de 7	0 de 7	0 de 7	0 de 7	0 de 7	0 de 7	0 de 6	0 de 6	0 de 5	0 de 5	0 de 4	0 de 4	0 de 3	0 de 3	0 de 2	0 de 2
C		0 de 44	0 de 44	0 de 5	0 de 5	0 de 5	1 de 5	2 de 5	4 de 5	4 de 5	4 de 5	3 de 5	3 de 5	2 de 5	4 de 5	2 de 5	2 de 5	0 de 3	0 de 3
Total		0 de 236	0 de 236	0 de 19	0 de 19	0 de 19	1 de 19	2 de 19	4 de 19	2 de 17	3 de 17	2 de 15	3 de 15	2 de 13	2 de 13	2 de 11	2 de 11	0 de 7	0 de 7
Condición		Denominador		Interpretación															
Se detecto el virus de PPC		1		Se detecto el antígeno de virus de PPC por ELISA Ag															
No se detecto el virus de PPC		0		No se detecto el antígeno del virus PPC por ELISA Ag															

N. Anexo: Detección de ácido nucleico (ARN) de PPC por RT-PCR anidada E2 y RT-qPCR 5'UTR en tejidos, pool de bazo y ganglios linfáticos.

Animal	Grupo	Día del Sacrificio o postvacunación	RT-PCR E2 primera extracción										RT-qPCR 5'UTR			
			Riñón	Pulmón	Tonsila	Ganglios submandibulares	Bazo	Médula ósea	Intestino	Ganglios mesentéricos	Cerebro	Pool de Bazo y Ganglios linfáticos	Tonsila	Pool de Bazo y Ganglios linfáticos		
2	A	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
9	B		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
3	C		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
3	A	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1	B		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1	A		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
10	B	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
8	A		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
4	B		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
6	A	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
5	B		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
5	A		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
6	B	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26.63	*2.10E+03	30.31	
7	A		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	35.78	*3.12E+00	0	
11	B		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	34.09	*1.04E+01	0	
12	A	22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	32.69	*2.78E+01	0	
12	B		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	34.37	*8.46E+00	0	
9	A		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33.93	*9.52E+00	0	
8	B	26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	34.70	*6.61E+00	0	
8	A		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	34.52	*7.63E+00	0	
10	A		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33.55	*1.52E+01	0	
7	B	29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	32.63	*2.93E+01	0	
2	C		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	28.78	*9.21E+02	0	
6	C		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	32.31	*3.66E+01	29.68	
4	A	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33.57	*1.43E+01	0	
2	B		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
11	A		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30.00	*1.91E+02	36.22
3	B		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	C		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	C		1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	29.78	*2.85E+02	28.66
5	C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
A		Consolidado por Grupo	0 de 12	0 de 12	1 de 12	0 de 12	0 de 12	0 de 12	0 de 12	0 de 12	0 de 12	0 de 12	7 de 12		2 de 12	
B			0 de 12	0 de 12	0 de 12	0 de 12	0 de 12	0 de 12	0 de 12	0 de 12	0 de 12	0 de 12	5 de 12		0 de 12	
C			2 de 6	1 de 6	3 de 6	1 de 6	2 de 6	2 de 6	2 de 6	2 de 6	2 de 6	2 de 6	3 de 6		2 de 6	
Total			2 de 30	1 de 30	4 de 30	1 de 30	2 de 30	2 de 30	2 de 30	2 de 30	2 de 30	2 de 30	15 de 30		4 de 30	
Condición		RT-PCR E2	RT-qPCR 5'UTR		Interpretación											
Se detecto RNA del virus de PPC		1	Ct ≤38		Se detecto el Ác. nucleico del virus de PPC por RT-PCR E2 o RT-qPCR 5'UTR											
			Ct> 38		Positivo débil la detección del Ácido nucleico del virus de PPC por RT-qPCR 5'UTR											
No se detecto RNA del virus de PPC		0	0		No se detecto el Ác. nucleico del virus de PPC por RT-PCR E2 o RT-qPCR 5'UTR											

*: Número de copias del virus (Región 5'UTR) que puede ser detectado en 5 µl

O. Anexo: Detección de ácido nucleico (ARN) de PPC por RT-PCR anidada E2 y RT-qPCR 5'UTR en sueros y leucocitos

Animal	Grupo	Dia 1, 2, 4 y 6				Dia 8 (RETO)				Dia 10				Dia 12				Dia 14				Dia 16				Dia 18				Dia 20				Dia 22				Dia 24				Dia 26				Dia 28				Dia 30			
		Muestreo 1, 2, 3 y 4 Sueros		Muestreo 1, 2, 3 y 4 Leucocitos		Muestreo 9 Sueros		Muestreo 9 Leucocitos		Muestreo 10 Sueros		Muestreo 10 Leucocitos		Muestreo 11 Sueros		Muestreo 11 Leucocitos		Muestreo 12 Sueros		Muestreo 12 Leucocitos		Muestreo 13 Sueros		Muestreo 13 Leucocitos		Muestreo 14 Sueros		Muestreo 14 Leucocitos		Muestreo 15 Sueros		Muestreo 15 Leucocitos		Muestreo 16 Sueros		Muestreo 16 Leucocitos																	
		RT-PCR E2	RT-qPCR 5'UTR	RT-PCR E2	RT-qPCR 5'UTR	RT-PCR E2	RT-qPCR 5'UTR	RT-PCR E2	RT-qPCR 5'UTR	RT-PCR E2	RT-qPCR 5'UTR	RT-PCR E2	RT-qPCR 5'UTR	RT-PCR E2	RT-qPCR 5'UTR	RT-PCR E2	RT-qPCR 5'UTR	RT-PCR E2	RT-qPCR 5'UTR	RT-PCR E2	RT-qPCR 5'UTR	RT-PCR E2	RT-qPCR 5'UTR	RT-PCR E2	RT-qPCR 5'UTR	RT-PCR E2	RT-qPCR 5'UTR	RT-PCR E2	RT-qPCR 5'UTR	RT-PCR E2	RT-qPCR 5'UTR	RT-PCR E2	RT-qPCR 5'UTR	RT-PCR E2	RT-qPCR 5'UTR	RT-PCR E2	RT-qPCR 5'UTR																
2	A	0	0	0	0																																																
9	B	0	0	0	0																																																
3	A	0	0	0	0																																																
1	B	0	0	0	0																																																
1	A	0	0	0	0																																																
10	B	0	0	0	0																																																
8	A	0	0	0	0																																																
4	B	0	0	0	0																																																
6	A	0	0	0	0																																																
5	B	0	0	0	0																																																
5	A	0	0	0	0																																																
6	B	0	0	0	0																																																
7	A	0	0	0	0																																																
11	B	0	0	0	0																																																
12	A	0	0	0	0																																																
12	B	0	0	0	0																																																
9	A	0	0	0	0																																																
8	B	0	0	0	0																																																
10	A	0	0	0	0																																																
7	B	0	0	0	0																																																
4	A	0	0	0	0																																																
2	B	0	0	0	0																																																
11	A	0	0	0	0																																																
3	B	0	0	0	0																																																
3	C	0	0	0	0																																																
6	C	0	0	0	0																																																
2	C	0	0	0	0																																																
4	C	0	0	0	0																																																
1	C	0	0	0	0																																																
5	C	0	0	0	0																																																
A	Consolidado	0 de 48	0 de 48	0 de 48	0 de 48	0 de 7	0 de 7	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6												
B	Consolidado	0 de 48	0 de 48	0 de 48	0 de 48	0 de 7	0 de 7	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6												
C	Consolidado	0 de 24	0 de 24	0 de 24	0 de 24	0 de 5	0 de 5	0 de 5	0 de 5	2 de 5	3 de 5	2 de 5	4 de 5	4 de 5	4 de 5	4 de 5	4 de 5	4 de 5	4 de 5	4 de 5	4 de 5	3 de 5	4 de 5	4 de 5	4 de 5	3 de 5	4 de 5	3 de 5	4 de 5	2 de 5	2 de 5	3 de 5	4 de 5	2 de 5	2 de 5	3 de 5	4 de 5	2 de 5	2 de 5	3 de 5	4 de 5												
Total		0 de 120	0 de 120	0 de 120	0 de 120	0 de 19	0 de 19	0 de 17	0 de 17	2 de 17	3 de 17	2 de 17	5 de 17	4 de 17	4 de 17	4 de 17	4 de 17	3 de 17	4 de 17	4 de 17	4 de 17	3 de 17	4 de 17	4 de 17	4 de 17	3 de 15	4 de 15	3 de 15	4 de 15	2 de 15	2 de 15	3 de 15	4 de 15	2 de 15	2 de 15	3 de 15	4 de 15																
Condición		RT-PCR E2		RT-qPCR 5'UTR																																																	
Se detectó RNA del virus de PPC		C<=38		C<=38																																																	
No se detectó RNA del virus de PPC		0		0																																																	
Interpretación																																																					
Se detectó el Ác. nucleico del virus de PPC por RT-PCR E2 o RT-qPCR 5'UTR																																																					
Positivo débil la detección de Ácido nucleico del virus de PPC por RT-PCR 5'UTR																																																					
No se detectó el Ác. nucleico del virus de PPC por RT-PCR E2 o RT-qPCR 5'UTR																																																					

* Número de copias del virus (Rinón S'UTR) que puede ser detectado en 5 µl

P. Anexo: Aislamiento del Virus de PPC en pooles de tejidos linfoides en cultivos celulares PK-15

Animal	Grupo	Día del Sacrificio o Postvacunación	Primer pase	Segundo pase	Tercer pase
2	A	6	0	0	0
9	B		0	0	0
3	C		0	0	0
6	A	16 Reto	0	0	0
5	B		0	0	0
7	A	22	0	0	0
11	B		0	0	0
12	A	24	0	0	0
12	B		0	0	0
9	A	26	0	0	0
8	B		0	0	0
10	A	29	0	0	0
7	B		0	0	0
2	C	29	0	0	0
6	C		1	N.R.	N.R.
4	A	30	0	0	0
2	B		0	0	0
11	A		0	0	0
3	B		0	0	0
1	C		0	0	0
4	C		1	N.R.	N.R.
5	C		0	0	0
A		Consolidado por Grupo	0 de 8	0 de 8	0 de 8
B			0 de 8	0 de 8	0 de 8
C			2 de 6	0 de 4	0 de 4
Total			2 de 22	0 de 20	0 de 20
Condición		Denominador	Interpretación		
Se aisló el virus de PPC		1	Positivo		
No se aisló el virus de PPC		0	Negativo		

N.R. : no se realizó

Bibliografía

1. Edwards S., Fukusho a., Lefevre P., Lipowski A., Pejsak Z., Roehe P. and Westergaard J. (2000b). "Classical swine fever: The global situation". *Veterinary Microbiology*. 73, 103-119.
2. Gonzalez G. y Torres M. (1995). " Enfermedades de etiología infecciosa que afectan la reproducción porcina". *Boletín técnico del CEISA No. 1. CORPOICA.*, 32.
3. www.oie/esp/oie/es. Organización Mundial de Sanidad Animal (2007).
4. Moennig, V., (2000). "Introduction to classical swine fever: virus, disease and control policy". *Veterinary microbiology*. 73: 93-102
5. Blood, D., Henderson, J., Kodostis, O. (1988). *Medicina Veterinaria*. 6a Edición. Editorial Interamericana. 771-777.
6. Paton D.J., Greiser I. (2003) " Classical swing fever- an update". *Research in Veterinary Science* 75- 169-178
7. Wengler, G. (1991). Familia Flaviviridae. In: Francki, R.I.B., Fauquet, C.M., Knudson, D.L., Brown, F. *Classification and Nomenclature of Viruses*. Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Vuruses. Springer, Berlin, p. 223-223.
8. Rice, C.M., Knipe, D. M., Fields, B.N., Howley, P. (1996). " Flaviviridae: the viruses and their replication". *Fundamental Virology*, 3rd ed. Lippincott Raven, Philadelphia, PA, pp. 931–959.
9. Meyers G.; Rüménapf T. and Thiel, H.J. (1989). " Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus". *Virology* 171, 555-567.
10. Moormann, R.J., Warmerdam P.A., Meer B.V.D. and Schaaper W.M.M. (1990). *Molecular cloning and nucleotide sequence of hog cholera virus strain Bresia and*

- mapping of the genomic region encoding envelope protein E1. *Virology* 177, 184-198.
11. Moennig V. and P.G. W. Plagemann. (1992). "The Pestivirus. *Advances on Virus Research*". 41, 53-98.
 12. Lindenbach and Rice C. (2001). "Flaviviridae: The Virus and Their Replication". En: *Fields Virology*. Vol 1. Cuarta edición.
 13. Moennig V., Floegel N. and Greiser W. (2003) "Clinical Signs and Epidemiology of Classical Swine Fever: A review of New Knowledge". *The Veterinary Journal* (2003), 165, 11-20.
 14. Meyers G. and Thiel H. (1996). "Molecular characterization of pestivirus". *Advances on Virus Research*. 47, 53-118.
 15. Sheng C.; Xiao M.; Geng X.; Liu J.; Wang Y.; Gu F. (2007). "Characterization of interaction of classical swine fever virus NS3 helicase with 3' untranslated region". *Virus Research* 129: 43-53.
 16. Van Oirschot, J.T. (1999). "Classical Swine Fever (Hog Cholera)". En: Sraw, B.; D'Allaire, S; Mengeling, W. and Taylor, D. *Diseases of Swine*. 8 edition. Cap. 14 p. 159-172.
 17. Collet, M.S.; Moenig V. and Horsinek, M.C. (1989). "Recent advances in Pestivirus research". *Journal of General Virology*. 70, 253-266.
 18. Lui Chen, Yan-hua Xia, Zi-shu Pan and Chu-yu Zhang (2007) "Expresion and functional characterization of classical swine fever virus E^{rns} protein" *Protein Expression and Purification* 55, 379-387
 19. Thiel, H-J.; Stark R.; Weiland E.; Rumenapf T. and Meyers G. (1991) "Hog cholera virus: Molecular composition of virion from a Pestivirus. *Journal of Virology*". 65:4705-4712.
 20. Weiland, E., Stark, R., Haas, B., Rumenapf, T., Meyers, G., Thiel, H.J., (1990). "Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer". *J. Virol.* 64, 3563-3569.
 21. Weiland, F., Weiland, E., Unger, G., Saalmuller, A., Thiel, H.J., (1999). "Localization of pestiviral envelope proteins E(rns) and E2 at the cell surface and on isolated particles". *J. Gen. Virol.* 80 (Pt. 5), 1157-1165.

22. Van Gennip, H.G., Bouma, A., van Rijn, P.A., Widjoatmodjo, M.N., Moormann, R.J., (2002). "Experimental non-transmissible marker vaccines for classical swine fever (CSF) by trans-complementation of E(rns) or E2 of CSFV". *Vaccine* 20, 1544–1556.
23. Hulst, M.M., Moormann, R.J., (1997). "Inhibition of pestivirus infection in cell culture by envelope proteins E(rns) and E2 of classical swine fever virus: E (rns) and E2 interact with different receptors". *J. Gen. Virol.* 78 (Pt. 11), 2779–2787.
24. Wang, Z., Nie, Y., Wang, P., Ding, M., Deng, H., (2004). "Characterization of classical swine fever virus entry by using pseudotyped viruses: E1 and E2 are sufficient to mediate viral entry". *Virology* 330, 332–341.
25. Meyers G.; Saalmüller A. and Büttner M. (1999). "Mutations abrogating the RNase activity in Glycoprotein E_{rns} of the Pestivirus Classical Swine Fever Virus lead to virus attenuation". *Journal of Virology.* 73, 10224-10235.
26. Chen L.; Xia Y.; Pan Z.; Zhang C. (2007) "Expression and functional characterization of classical swine fever virus E^{rns} protein". *Protein Expression and Purification.* 55, 379-387.
27. Tang F.; Pan Z.; Zhang C. (2007). "The selection pressure analysis of classical swine fever virus envelope protein genes E^{rns} and E2." *Virus Research* 131, 132-135.
28. Lowings, P., Ibata, G., Needham, J., Paton, D., (1996). "Classical swine fever virus diversity and evolution". *J. Gen. Virol.* 77 (Pt. 6), 1311–1321.
29. Van Rijn, P.A.; Van Gennip, H.G.P.; Leederse, CH.; Brusckhe, C.J.M.; Paton, D.J.; Moormann, R.J.M. and Van Oirschot, J.T. (1997). "Subdivision of the Pestivirus Genus Based on Envelope Glycoprotein E2. *Virology.* 37, 337-348.
30. Ning C., Hongxia H., Zhanfeng Z., Jiangbing S., Lingli J., Weihuan F. (2008) "Genetic diversity of the envelope glycoprotein E2 of classical swine fever virus: Recent isolates branched away from historical and vaccine strains" *Veterinary Microbiology* 127, 286–299
31. Risatti, G.R., Borca, M.V., Kutish, G.F., Lu, Z., Holinka, L.G., French, R.A., Ulman, E.R., Rock, D.L., (2005). The E2 glycoprotein of classical swine fever virus is a virulence determinant in swine. *J. Virol.* 79, 3787–3796

32. Van Gennip, H.G., Vlot, A.C., Hulst, M.M., De Smit, A.J., Moormann, R.J., (2004). "Determinants of virulence of classical swine fever virus strain Brescia". *J. Virol.* 78, 8812–8823.
33. Hulst, M.M., Westra, D.F., Wensvoort, G., Moormann, R.J., (1993). "Glycoprotein E1 of hog cholera virus expressed in insect cells protects swine from hog cholera". *J. Virol.* 67, 5435–5442.
34. Moulin Hervé R., Seuberlich Torsten, Bauhofer Oliver, Bennett Lea C., Tratschin Jon-Duri, Hofmann Martin A., Ruggli Nicolas (2007). "Nonstructural proteins NS2-3 and NS4A of classical swine fever virus: Essential features for infectious particle formation" *Virology* 365, 376-389.
35. Harada, T., Tautz, N., Thiel, H.J. (2000). "E2-p7 region of the bovine viral diarrhea virus polyprotein: processing and functional studies". *J. Virol.* 74, 9498–9506.
36. Elbers, K., Tautz, N., Becher, P., Stoll, D., Ru\$ menapf, T. & Thiel, H.-J. (1996). "Processing in the pestivirus E2±NS2 region : Identification of protein p7 and E2p7". *Journal of Virology* 70, 4131±4135.
37. Agapov, E.V., Murray, C.L., Frolov, I., Qu, L., Myers, T.M., Rice, C.M., (2004). "Uncleaved NS2-3 is required for production of infectious bovine viral diarrhea virus". *J. Virol.* 78, 2414–2425.
38. Behrens, S.E., Grassmann, C.W., Thiel, H.J., Meyers, G., Tautz, N., (1998). "Characterization of an autonomous subgenomic pestivirus RNA replicon". *J. Virol.* 72, 2364–2372.
39. Gil, L.H., Ansari, I.H., Vassilev, V., Liang, D., Lai, V.C., Zhong, W., Hong, Z., Dubovi, E.J., Donis, R.O., (2006). The amino-terminal domain of bovine viral diarrhea virus Npro protein is necessary for alpha/beta interferon antagonism. *J. Virol.* 80, 900–911.
40. Lai, V.C.H., Zhong, W.D., Skelton, A., Ingravallo, P., Vassilev, V., Donis, R.O., Hong, Z., Lau, J.Y.N., (2000). "Generation and characterization of a hepatitis C virus NS3 protease-dependent bovine viral diarrhea virus". *J. Virol.* 74, 6339–6347.
41. Moser, C., Stettler, P., Tratschin, J.D., Hofmann, M.A., (1999). "Cytopathogenic and noncytopathogenic RNA replicons of classical swine fever virus". *J. Virol.* 73, 7787–7794.

42. Tratschin, J.D., Moser, C., Ruggli, N., Hofmann, M.A., (1998). "Classical swine fever virus leader proteinase Npro is not required for viral replication in cell culture". *J. Virol.* 72, 7681–7684.
43. Aynaud, J., Asso, J, (1970) "Lapinised called Chinese strain of the classical swine fever virus". *Rec. Med. Vet.* CXLVI No. 2 Feb : 119-139
44. Qiu H S., Shen R. and Tong G. (2006). " The Lapinized Chinese Strain Vaccine Against Classical Swine Fever Virus: A Retrospective Review Spanning Half a Century". *Agriculture Sciences China.* 5(1):1-14.
45. Wang Z. S. (1996). " Retrospective and prospect of the control of classical swine fever. In: *Progress in Immunological Prevention of important Infectious Diseases of Animals*". China Agriculture Press, Beijing. 64-71.
46. Bran L, Mihaita S, Popa M. (1996). "On the stability of some biological characteristics of the C strain of lapinized swine pest virus". *Bulletin de L'office International des Epizooties* 66, 681-693.
47. Aynaud J M. (1988). "Classical Swine Fever and Related Viral Infections". Martinus Nijhoff Publishers, Boston. 165-180.
48. Qiu H S., Lang H. W., Wang Z. S. (1997). " Trials on the protection against wild-type hot cholera viruses in China with C-strain vaccine". *Annual Reports of Chinese Veterinary Microbiology Association in 1997.* 115-117.
49. Bran L, Mihaita S, Popa M. (1971). "Trans-uterine and transplacental transmission, in pregnant sows". *Arch Veterinary Bucuresti.* 23, 11-20.
50. Kojnok J, Palatka Z, Bognar K. (1980). "Requirements of rabbit-adapted swine fever vaccine". *Archiv fur Experimentelle Veterinarmedizin.* 34, 67-72.
51. Terpstra C. (1978). "Detection of C-strain virus in pigs following vaccination against swine fever". *Tijdschrift Loo Diergeneeskunde.* 103, 678-684.
52. Lorena J., Barlic-Maganja D, Lojkic M, Madic J. Grom J. Cac Z, Roic B, Terzic S, Lojkic I., Polancec D, Cajavec S. (2001). " Classical swine fever virus (C-strain) distribution in organ samples of inoculated piglets". *Veterinary of Microbiology.* 81, 1-8.
53. Kaden V, Lange B. (2001). "Oral immunization against classical swine fever (CSF): onset and duration of immunity". *Veterinary Microbiology.* 82, 301-310.
54. Beer M.; Reimann I.; Hoffmann B. and Depner K. (2007). "Novel marker vaccines against classical swine fever". *Vaccine* 1-6

55. Precauste P, Kato F, Brun A. (1983). "Swine fever. Immunization of piglets. *Comparative Immunology*", *Microbiology and Infectious Diseases*. 6, 281-289.
56. Terpstra C. (1990). "Development and properties of a cell culture produced vaccine for hog cholera based on the Chinese strain". *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 97, 77-79.
57. Suradhat S., Intrakamhaeng M., Damrongwatanapokin S. (2001). "The correlation of virus-specific interferon-gamma production and protection against classical swine fever virus infection". *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 83. 177-189
58. Graham S., Everett H., Johns H., Hines F., La Roca S., Khatri M., Wright I., Drew T., Crooke H., (2010). "Characterisation of virus-specific peripheral blood cell cytokine response following vaccination or infection with classical swine fever virus". *Veterinary Microbiology*. 142. 34-40
59. Suvintrakorn K., Hanveerraphon A., Pariyakanok V. (1993) "Efficacy of lapinized swine fever vaccine in piglets born from immune sows". *Thai Vet. Med. Assoc.* 23. 93-103.
60. Parchariyanon S., Tantaswasdi U., Pinyochon W., Methiyapun P. (1994) "Immunity against swine fever vaccine. II Immunity against swine fever vaccine in piglets and protection level of maternal immunity in piglets before vaccination. *J. Thai. Vet. Med. Assoc.* 45. 37-45.
61. Suradhat S., Damrongwatanapokin S., Thanawongnuwech R. (2007). "Factor critical for successful vaccination against classical swine fever in endemic areas" *Veterinary Microbiology* 119: 1-9.
62. Villamil, M., Sabogal, R., Gómez, T., Orjuela, M., Ruíz, S., Arbeláez, R. Rincón M., Mogollón G. (1998). "Evaluación de las vacunas de peste porcina producidas en células y comercializadas en". *Porcicultura Colombiana.*, n.58, p.32 – 35.
63. Mebus, C. Peste Porcina Clásica. (1980) "Guía práctica de técnicas de diagnóstico de la peste porcina africana". USDA-APHIS-NVSL-USA
64. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), Cuarta Edición (2004). "Manual de las pruebas de Diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres (mamíferos, aves y abejas)". 247-248, 267-274.
65. Paton D. J. (1995) "Pestivirus diversity. *J. Comp Path.* 112, 215-236.

66. Greiser I., Blome S., Moennig V. (2007). "Diagnostic methods for detection of Classical swine fever virus - Status quo and new developments" *Vaccine* 25; 5524-5530.
67. Colijn E.O., Bloemraad M. and Wensvoort G. (1997) "An improved ELISA for the detection of serum antibodies directed against classical swine fever virus". *Veterinary Microbiology* 59, 15-25.
68. Wensvoort, G., Bloemraad, M., Terpstra, C. (1998) "An Enzyme Immunoassay employing motional antibodies and detection to classical swine fever virus". *Veterinary Microbiology*, 17: 129-140.
69. Holm J. M. (1981). "Detection of antibodies against hog cholera virus and bovine viral diarrhoea virus in porcine serum" *Acta Vet. Scand.* 22, 85-98.
70. Martin J., (1997) "Immunohistochemical detection of hog cholera viral glicoproteína 55 in paraffin – embedded tissues". *J Vet Diagn Invest.* 9, 10-16.
71. Terpstra C (2000). "Classical swine fever (hog cholera). In *Manual of Standards for Diagnostic Test Vaccines*. 4 th ed Office International des Epizooties, World Organization for Animal Health pp 202-203.
72. Díaz de Arce, H., Núñez J. L., Ganges L., Barreras M., Frías M.T. and Sobrino F. (1998). "And RT-PCR assay for the specific detection of classical swine fever virus in clinical samples". *Vet. Res.* 29, 431-440.
73. Urška Jamnikar Ciglenc̃ki, Jože Grom, Ivan Toplak, Lorena Jemeršić, Darja Barlič- Maganja (2008). "Real-time RT-PCR assay for rapid and specific detection of classical swine fever virus: Comparison of SYBR Green and TaqMan MGB detection methods using novel MGB probes". *Journal of Virological Methods*, Volume 147, Issue 2, 257-264.
74. Instituto Colombiano Agropecuario – ICA, Laboratorio Nacional de Diagnóstico Veterinario, Laboratorio de Histotecnia. (1978) "Manual de Técnicas del Programa Patología - Toxicología". *Boletín Técnico* No. 51., 37-40
75. Instituto Colombiano Agropecuario – ICA, Centro de Investigación en Salud y Producción Animal (1993). "Enfermedades Virales Porcinas" *Manual de Técnicas Serológicas* 1-25.
76. Instituto Colombiano Agropecuario – ICA, Laboratorio Nacional de Diagnóstico Veterinario, Laboratorio de Medicina Porcina. (2006) "Manual de Técnicas Analíticas".

77. Paton DJ, McGoldrick A, Greiser-Wilke I, Parchariyanon S, Song JY, Liou PP, Stadejek T, Lowings JP, Bjorklund H, Belak S. (2000). "Genetic typing of classical swine fever virus". *Vet. Microbiol* 73:137-157
78. Liu L., Widén F., Baule C., Belák S. (2007). "A one-step, gel-based RT-PCR assay with comparable performance to real-time RT-PCR for detection of classical swine fever virus". *Journal of Virological Methods* 139: 203–207.
79. Handel K., Kehler H., Hills K., Pasick J. (2004). "Comparison of reverse transcriptase-polymerase chain reaction, virus isolation, and immunoperoxidase assays for detecting pigs infected with low, moderate, and high virulent strains of classical swine fever virus". *J. Vet. Diagn. Invest.* 16:132-138
80. Sabogal Z., Mogollón J., Rincón M., Clavijo A. (2006) "Phylogenetic analysis of recent isolates of classical swine fever virus from Colombia". *Virus Research* 115 : 99–103
81. Elbers A., Vos J., Bouma A., Exsel Ad., Stegeman A. (2002). "Quantitative assessment of clinical signs for the detection of classical swine fever outbreaks during an epidemic". *Veterinary Microbiology* 85, 323-332.
82. Koenig P., Hoffmann B., Depner K., Reimann I., Teifke J. Beer M. (2007). "Detection of classical swine fever vaccine virus in blood and tissue samples of pigs vaccinated either with a conventional C-strain vaccine or modified live marker vaccine.
83. Elbers A., Vos J., Bouma A., Exsel Ad., Stegeman A. (2003) "Assessment of the use of gross lesions at post-mortem to detect outbreaks of classical swine fever". *Veterinary Microbiology* 96, 345-356.
84. Lee W.C., Wang M.S. and Chien M.S. (1999) "Virus antigen expression and interactions in peripheral blood mononuclear cell subpopulation after classical swine fever virus infection" *Veterinary Microbiology* 67, 17-79.
85. Dong X. N, Wei K, Liu Z Q, Chen Y. H. (2002). "Candidate peptide vaccine induced protection against classical swine fever virus". *Vaccine.* 21, 167-173.
86. Van Zijl M, Wensvoort G. de Kluyver E, Huls M, van der Gulden H, Gielkens A, Berns A, Moormann R. (1991). "Live attenuated pseudorabies virus expressing envelope glycoprotein E1 of hog cholerae virus protects swine against both pseudorabies and hog cholera". *Journal of Virology.* 65, 2761-2765.

87. Yu X, Tu C, Li H, Hu R, Chen C, Li Z, Zhang M, Yin Z. (2001). "DNA-mediated protection against classical swine fever virus". *Vaccine*. 19, 1520-1525.
88. Floegel-Niesmann G, Bunzenthal C, Fischer S, Moennig V. "Virulence of recent and former Classical Swine Fever virus isolates evaluated by their clinical and pathological signs" (2003). *J Vet Med B*. 50:214-20.
89. EU Diagnostic Manual for Classical Swine Fever (CSF) Diagnosis. Technical Part. Third Draft June. 2007.
90. Oude O. R. J. A., Morrissy C. J., Boyle D. B. (2006). "Detection and quantitative pathogenesis study of classical swine fever virus using a real time RT-PCR assay" *Journal of Virology Methods*. 131, 78-85.
91. Van Oirschot J.T. (2003). "Vaccinology of classical swine fever from lab to field". *Veterinary Microbiology* 96, 367-384.
92. Weesendorp E., Stegeman A., Loeffen W. L.A. (2009). "Quantification of classical swine fever virus in aerosols originating from pigs infected with strains of high, moderate or low virulence". *Veterinary Microbiology* 135, 22-230.
93. Deng R and Bronk K. V. (1993). "5' and 3' translated regions of Pestivirus genome: primary and secondary structure analysis". *Nucleic Acid. Res.* 21, 1949-1957.
94. Blone S., Meindl-Bohmer A., Loeffen W., Thuner B. and Moennig V. (2006). "Assessment of classical swine fever and vaccine performance". *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 25 (3), 1025-1030.
95. De las Mulas J. M., Ruiz-Villamor E., Donoso S., Quezada M., Lecocq C. and Sierra M. A. (1997) "Immunohistochemical detection of hot cholera viral glycoprotein 55 in paraffin-embedded tissues". *J. Vet. Diagn. Invest.* 9, 10-16.
96. Pereda A. J., Greise-Wilke I., Schmitt B., Rincón M. A, Mogollón J. D., Sabogal Z.Y., Lorena A. M., Sanguinetti H. and Piccone M.E. (2005) "Phylogenetic analysis of Classical Swine Fever (CSFV) field isolate from outbreaks in South and Central America". *Virus Research* 110, 11-118.
97. Oude O. R., Morrissy C. J. and Boyle D. B. (2006) "Detection and quantitative pathogenesis study of classical swine fever using a real time RT-PCR assay". *Journal Virological Methods* 131, 78-85.
98. Hoffmann B., Depner K., Shirrmeier H. and Beer M. (2006). "A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assay used in a detection system for pestiviruses". *Journal of Virological Methods* 136, 200-209.

99. Hoffmann B., Beer M., Schelp C., Shirrmeier H. and Depner K. (2005). "Validation of a real-time RT-PCR assay for sensitive and specific detection of classical swine fever". *Journal of Virological Methods* 130, 36-44.
100. Steel R. J. D., Torrier J.H. (1998). "Principles and procedures of statistics: A Biometrical Approach". 2nd ed. McGraw-Hill Book. Co. New York.
101. Montgomery D. (2006). "Diseño y Análisis de Experimentos". 2ed. Limusa Wiley. Balderas 95, México D.F.
102. Hendrix C. M. (2002). "Laboratory Procedures for Veterinary Technicians". 4th. Mosby. USA. St. Louis Missouri. 34-50.
103. Straw E.B., D'Allaire S and Taylor D. (1999). "Diseases of Swine". 8th. Iowa State University Press. Iowa. USA. 159-172
104. Uttenthal A., Storgaard T., Oleksiewicz M. B. and de Stricker K. (2003). "Experimental infection with the Paderborn isolate of classical swine fever virus in 10-week-old pigs: determination of viral replication kinetics by quantitative RT-PCR, virus isolation and antigen ELISA". *Veterinary Microbiology* 92, 197-212.
105. Haegeman A., Dewulf J., Vrancken R., Tignon M., Ribbens S., Koenen F. (2006). "Characterisation of the discrepancy between PCR and virus isolation in relation to classical swine fever virus detection". *Journal of Virological Methods* 136, 44-50.
106. Oude Ophuis R., Morrissy C., Boyle D. (2006). "Detection and quantitative pathogenesis study of classical swine fever virus using a real time RT-PCR assay". *Journal of Virological Methods* 131, 78-85.
107. Depner K., Hoffmann B., Beer M. (2007). "Evaluation of real-time RT-PCR assay for the routine *intra vitam* diagnosis of classical swine fever". *Veterinary Microbiology* 121, 338-343.
108. Le Dimna M., Vrancken R., Koenen F., Bougeard S., Mesplede A., Hutet E., Kuntz-Simon G., Le Potier M.F. (2008). "Validation of two commercial real-time RT-PCR kits for rapid and specific diagnosis of classical swine fever virus". *Journal of Virological Methods* 147, 136-142.