



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
CENTRO DE ESTUDIOS DE BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

Título: **OBTENCIÓN DE EL VSM DE UNA CEPA
VACUNAL CONTRA LA PESTE PORCINA
CLÁSICA ADAPTADA A LA LÍNEA CELULAR RK-
13.**

*Tesis presentada en Opción al Título Académico de Master en
Biotecnología.
Mención Industrial.*

Autora: Lic. Dulce María León Fernández.

*Tutores: Dr. Rafael Polanco.
MSc. Tania Campos Cuello.*

Consultante: MSc. Humberto J. Morrís Quevedo.

Año 2005.

"Año de la Alternativa Bolivariana para Las Américas"

*La ciencia trascendental es la verdad única,
generosa y matriz de todo género y toda clase
de verdades....*

*....la ciencia no es ...ni misterio de iniciados,
ni privilegio de los aristócratas de la mente,
sino el medio único que tiene el hombre de
explicarse las leyes de la vida....*

José Martí

Dedicatoria

A mi esposo Ing. Leonardo Charon Duríve, que con su ayuda incondicional he podido superarme una vez mas en mi vida.

A mis hijas María del Carmen y Leonor que han sabido comprender y soportar la lejanía de su madre en el desarrollo experimental del trabajo.

A mis familiares que han sabido brindar afecto y apoyo en cada momento.

A los técnicos y profesionales de la Empresa LAPROVIR # 7 del Grupo Empresarial LLABIOFAM.

A la amiga y tutora Msc. Tania Campos Cuello por permitirme trabajar a su lado y brindarme todo el conocimiento y apoyo necesario.

A la Dr. Norka por ayudarme en cada momento para lograr estos resultados.

A mis compañeros Yenis y Alberto por los momentos pasados.

Indice	Pág.
Contenidos	
Introducción-----	1
Capítulo 1: Revisión bibliográfica-----	3
1 Enfermedad.-----	3
1.1 Etiología.-----	3
1.2 Resistencia a la acción física y química-----	3
2 Biología molecular.-----	4
2.1 Ácido nucleico viral.-----	4
2.2 Proteínas virales.-----	4
2.3 Proteínas de la envoltura-----	4
2.4 Proteínas no estructurales.-----	5
2.5 Proteínas inmunogénicas.-----	5
2.6 Replicación de Pestivirus-----	5
3 Relaciones entre Pestivirus-----	6
4 Respuesta inmune al VPPC.-----	6
4.1 Respuesta inmune humoral.-----	7
4.1.1 Anticuerpos Neutralizantes y Protección.-----	8

4.2	Respuesta inmune celular.-----	8
5	Signos clínicos y lesiones de la PPC.-----	8
6	Diagnóstico.-----	10
6.1	Diagnóstico diferencial.-----	10
6.2	Diagnostico de Laboratorio.-----	10
7	Estrategias de vacunación contra la PPC.-----	12
8	Cultivos Celulares y sus aplicaciones en Virología.-----	13
	Capitulo 2. Materiales y Métodos.-----	15
2.1	Equipamiento y materiales generales empleados en la Investigación-----	15
2.1.1	Materiales.-----	15
2.1.2	Equipos-----	15
2.1.3	Reactivos-----	16
2.1.4	Soluciones-----	16
2.1.5	Sustrato Celular y medios para los cultivos celulares.-----	16
2.2	Animales-----	17
2.3	Inmunógeno-----	17
2.4	Métodos-----	17
2.4.1	Evaluación de la calidad de la línea celular RK-13, utilizada como sustrato celular. [Código Federal de Regulaciones -9 (CFR-9)].-----	17
2.4.1.1	Pureza-----	17
2.4.1.2	Requisitos Generales-----	18
2.4.2	Determinación de la presencia del antígeno vacunal por IFD en la Línea Celular RK-13.-----	19
2.4.3	Ultrafiltración del antígeno vacunal.-----	20
2.4.3.1	Determinación por Inmunofluorescencia del Título viral del Antígeno concentrado.-----	20
2.4.4	Liofilización del Antígeno vacunal.-----	20
2.4.4.1	Evaluación de la pureza del VSM-----	21
2.4.4.2	Inocuidad del VSM-----	21
2.4.4.3	Evaluación de las DP ₅₀ del VSM mediante la prueba de potencia-----	22
2.4.4.4	Evaluación de la replicación y cálculo del título viral del VSM en Conejos-----	22
2.4.5	Elaboración de un lote de la vacuna en cultivo celular contra la PPC a escala de laboratorio-----	22
	Capitulo 3. Resultados y Discusión.-----	24
3.1	Evaluación de la calidad de la línea celular RK-13, utilizada como sustrato celular.-----	24
3.1.1	Pureza.-----	24
3.1.2	Requisitos Generales-----	25
3.1.2.1	BCM y BCT de la línea celular RK-13-----	26
3.2	Determinación de la presencia del antígeno vacunal por IFD-----	27
3.3	Evaluación de la pureza del VSM-----	28

3.3.1 Inocuidad-----	28
3.4 Evaluación de las DP ₅₀ del VSM-----	29
3.5 Evaluación de la replicación y cálculo del título viral del VSM en conejos-----	30
3.6 Elaboración de un lote piloto a escala de laboratorio-----	32
Conclusiones-----	33
Recomendaciones-----	34
Bibliografía	
Anexos	

RESUMEN

En el presente trabajo se logró obtener el Virus Semilla Maestro (VSM) para la elaboración de una vacuna convencional contra la Peste Porcina Clásica (PPC) a partir de la adaptación de la cepa China Lapinizada, a la línea celular RK-13, teniendo en cuenta el Manual Estándar de la Oficina Internacional de Epizootias (OIE). Para ello se replicó la cepa adaptada en la Línea Celular y mediante la técnica de Inmunofluorescencia Directa se demostró la presencia del virus en las células cultivadas. Se determinó el título del antígeno vacunal, obteniéndose un valor de $10^{4.5}$ u/mL y por otra parte se evaluó la potencia del VSM expresada como el número de dosis protectivas media (DP₅₀) en una dosis de vacuna, que resultó de $10^{2.75}$ DP₅₀, encontrando los cerdos susceptibles un 100% de protección. El desarrollo de la vacuna a escala de laboratorio contra la PPC permitirá diseñar una tecnología más limpia, de mayor calidad, con niveles productivos superiores para satisfacer las demandas de los clientes de la Empresa. Esta vacuna en cultivo celular ahorrará 3840.74 MN anualmente, en comparación con la vacuna tradicional que utiliza conejos para su producción.

ABSTRACT

In this work was possible to obtain the Virus Seed Teacher (VSM) for the elaboration of a conventional vaccine against the Classic Swinish Pest (PPC) starting from the adaptation of the stump China Lapinizada, to the cellular line RK-13, keeping in mind the Standard Manual of the International Office of Epizootias (OIE). For it was replied the stump adapted in the Cellular Line and by means of the technique of Direct Inmunofluorescencia the presence of the virus was demonstrated in the cultivated cells. The title of the antigen vacunal was determined, being obtained a value of $10^{4.5}$ u/mL and on the other hand the power of the VSM was evaluated expressed as the I number of dose half protective (DP_{50}) in a vaccine dose that resulted $10^{2.75} DP_{50}$, finding the susceptible pigs 100 protection%. The development of the vaccine to laboratory scale against the PPC will allow to design a technology cleaner, of more quality, with levels productive superiors to satisfy the demands of the clients of the enterprise. This vaccine in cellular cultivation will save 3840.74 MN saved annually, in comparison with the traditional vaccine that uses rabbits for its production.

Introducción.

La Biotecnología ha tenido un gran impacto en la salud animal y en este sentido, ha sido un pilar imprescindible para el desarrollo de vacunas cada vez más eficaces y seguras para este sector.

Esta ciencia multidisciplinaria hoy día está orientada al desarrollo de diferentes productos y procedimientos, como los anticuerpos monoclonales, las técnicas de ADN recombinante o Ingeniería Genética y los métodos de cultivo de células y tejidos, sistemas novedosos utilizados para alterar o modificar las propiedades genéticas de los organismos de una forma totalmente dirigida.

Estos avances han sido responsables, en gran medida, del notable interés científico y comercial despertado en la Biotecnología, en general, y en sus aplicaciones médico-veterinarias en particular, como uno de sus principales sectores de influencia.

En nuestro país, la Empresa de los Laboratorios Biológicos Farmacéuticos (LABIOFAM), produce, además de suplementos dietéticos la mayoría de las formulaciones farmacéuticas y biológicas, para combatir las enfermedades de los animales; entre las que se destacan las diferentes vacunas virales que confieren inmunidad contra enfermedades como la Encefalomiелitis Equina del Este, Aujeszky, Newcastle, Gumboro, la Peste Porcina Clásica (PPC), entre otras. Las fichas técnicas de estas y otras vacunas son revisadas anualmente y la armonización es uno de los principales acuerdos de esta actividad.

La PPC es una enfermedad infectocontagiosa de origen viral producida por un pequeño virus ARN envuelto, que por su carácter transfronterizo afecta amplias regiones geográficas, ocasionando restricciones al Comercio Internacional de carne de cerdo y sus derivados.

Desde 1962 LABIOFAM elabora una vacuna contra la PPC que utiliza conejos como biomodelo para la replicación viral.

Sin embargo los informes establecidos por la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) refieren numerosos estudios de la Cepa China Lapinizada, con el fin de obtener vacunas en cultivos celulares que confieren 100 Dosis Protectivas Media (100 DP₅₀).

Al respecto, es oportuno señalar que el desarrollo de cultivos celulares para la Virología ha sido el punto de partida que ha permitido la replicación y el conocimiento de este tipo de agente, así como la producción de vacunas, para la prevención y control de las enfermedades virales, lo que ha conducido a un desarrollo biotecnológico a escala industrial.

Tomando en cuenta los elementos anteriormente planteados y la necesidad de aumentar sus producciones e insertarse en el mercado internacional, la Empresa de los Laboratorios Viroológicos (LAPROVIR #7), perteneciente a LABIOFAM, ha estudiado la adaptación de la cepa China Lapinizada, a la línea celular RK-13 para obtener un Virus Semilla Maestro (VSM) que permita elaborar una vacuna convencional contra la PPC, y confeccionar una tecnología mas limpia, de mejor calidad y menos costosa.

A partir del problema anteriormente mencionado, en el presente trabajo se propuso la siguiente hipótesis:

- ❖ Si la cepa adaptada al cultivo celular de la línea RK-13 reúne los requisitos establecidos por la OIE, es posible disponer del VSM para elaborar una vacuna contra la PPC en cultivo celular, capaz de inmunizar a cerdos susceptibles contra esta enfermedad.

Se trazaron los siguientes objetivos:

Objetivo General:

Obtener un Virus Semilla Maestro a partir de la cepa China Lapinizada adaptada en la línea celular RK-13, para elaborar una vacuna contra la Peste Porcina Clásica a escala de laboratorio.

Objetivos Específicos:

- a) Evaluar la calidad de la línea celular RK-13, utilizada como sustrato celular, que está depositada en el Dpto. de Cultivos Celulares, de la Empresa LAPROVIR #7 (Grupo Empresarial LABIOFAM).
- b) Determinar por Inmunofluorescencia Directa (IFD) la presencia del antígeno vacunal en el cultivo celular RK-13 y sus títulos.
- c) Evaluar la pureza e Inocuidad del VSM.
- d) Determinar la potencia del VSM en cerdos susceptibles y conejos.

Capítulo 1, Revisión Bibliográfica

1. Enfermedad.

La Peste Porcina Clásica (PPC) es una enfermedad de origen viral, que por su alta contagiosidad y su amplia distribución mundial es considerada una de las enfermedades infecciosas más importantes del cerdo, de ahí su inclusión en la lista A de enfermedades de notificación obligatoria en la Oficina Internacional de Epizootia (OIE) y una de las enfermedades estratégicas para América. La misma afecta tanto al cerdo doméstico como al salvaje y se caracteriza por un cuadro hemorrágico con una alta morbilidad y mortalidad de los rebaños susceptibles. (FAO, 2000)

1.1 Etiología.

La PPC es causada por un pequeño ARN virus, envuelto (HCV o VPPC), de forma esférica, con un diámetro entre 40 y 50 nm, que junto al virus de la Diarrea Viral Bovina (BVDV o VDVB) y el virus de la Enfermedad de la Frontera en ovejas (EF), conforman el género Pestivirus. Están muy relacionados desde el punto de vista estructural y antigénico, así como por su espectro de hospederos. Posee una alta homología tanto nucleotídica como aminoacídica, lo cual ha sido demostrado por pruebas de Inmunodifusión e Inmunofluorescencia. (Frías y col, 2003, Franci, 1991)

La cápside de simetría icosaédrica posee un diámetro aproximado de 29-30 nm. La densidad de flotación se encuentra entre 1.12 y 1.17 g/mL y el coeficiente de sedimentación tiene un valor de 140-180 S. (Horzinek, 1981)

1.2 Resistencia a la acción física y química.

Debido a la presencia de lipoproteínas en su envoltura, el virus se inactiva rápidamente con cloroformo, éter y β -propiolactona, así como con detergentes, como el Nonidet P-40, desoxicolato y saponina. También es sensible a la acción de radiaciones ultravioletas. La infectividad se pierde fácilmente sometiendo el virus a la temperatura de 60°C durante 10 min. o a una temperatura menor si se aumenta el tiempo de exposición. (Haas et al., 1995)

Las enzimas proteolíticas como la tripsina ejercen una inactivación moderada de la infectividad. El virus es muy estable en un amplio intervalo de pH que va desde 5 hasta 10, a temperaturas de -20°C y -70°C, así como liofilizado. (Depner et al., 1995)

La supervivencia del virus en la naturaleza y su resistencia a la desecación depende tanto del medio ambiente (temperatura, humedad, pH, presencia de materia orgánica y exposición a sustancias químicas), como del sustrato en que

se encuentre (sangre, saliva o heces). Debido a la supervivencia del virus en un amplio intervalo de pH, la acidez cadavérica no lo destruye, por lo que se conserva durante un tiempo variable en carnes frescas, ahumadas y congeladas, lo que contribuye a su diseminación y a la aparición de brotes de la enfermedad en áreas libres de PPC. (Depner et al., 1992)

2. Biología molecular.

2.1 Ácido nucleico viral.

Las primeras investigaciones sobre el VPPC estuvieron dirigidas hacia la identificación y caracterización del ácido nucleico viral. Este actúa como ARN mensajero y es traducido en una poliproteína de aproximadamente 4000 aminoácidos que es procesada cotraduccional y postraduccionalmente por proteasas, codificadas por la célula y por el virus. (Van Oirschot, 1983)

En la secuencia del genoma, la primera proteína codificada es una autoproteasa no estructural (la proteína p23 o Npro. (Meyer, 1989). Seguidamente se encuentran codificadas 4 proteínas estructurales: una de la cápside (p14 o C) y tres de la envoltura viral [E0(gp 44/48), E1(gp33) y E2(gp55)]. (Hulst, 1993; Schneider, 1993). (Fig. 1)

2.2 Proteínas virales.

Npro o p23 Actúa como autoproteasa y además, juega un papel fundamental en la citopatogenicidad del virus.- La p 14 o C.- Es liberada de la p23, se ha referido que puede tener función de regulador transcripcional en el ciclo de vida del virus. (Horzinek, 1981; Hulst, 1994)

2.3 Proteínas de la envoltura.

Un pre-requisito para que ocurra la liberación del virus es la expresión de estas glicoproteínas. Se ha comprobado que la E0 o Erns (gp44) presenta actividad ARNasa, gracias a la cual se previene la inducción de apoptosis y con ello la lisis de la célula, por lo que su expresión es importante en la adaptación de los Pestivirus a sus hospederos y para su supervivencia y evolución. (Schneider, 1993; (Hulst, 1994) La E1 es hidrofóbica y puede funcionar como una proteína transmembrana, sirviendo como ancla para la E2, la cual es estructural, inmunodominante y neutralizante. Las tres glicoproteínas existen en forma de dímeros enlazados por puentes disulfuro que aparecen en las células infectadas y en los viriones. (Hulst , 1994).

2.4 Proteínas no estructurales.

Según Paton (1995) la NS2-3, se ha descrito como una helicasa; la NS3 también induce anticuerpos después de la infección, pero éstos no son neutralizantes. La NS4a actúa como cofactor para la actividad proteasa de la NS3. Las funciones de las NS4b, NS5a-b no están aún determinadas, aunque la NS5b está considerada como una ARN polimerasa ARN dependiente. En general, estas proteínas participan en los mecanismos de replicación y traducción del virus. La NS5B es muy conservada entre todos los Pestivirus, siendo utilizada para realizar estudios de relaciones filogenéticas entre cepas. (Hofmann et al, 1994; Lowings, 1996)

2.5 Proteínas inmunogénicas.

Solo las proteínas de la envoltura E0 y E2 son capaces de inducir anticuerpos neutralizantes frente al virus, siendo la E2 la más inmunogénica y la que administrada sola a los cerdos confiere actividad protectora. Por esta razón es un candidato ideal para el desarrollo de vacunas recombinantes, así como para el diagnóstico serológico, además de inducir anticuerpos neutralizantes. Los anticuerpos monoclonales inducidos contra la E2 y la Erns son capaces de diferenciar el VPPC de otros Pestivirus. (Wensvoort, 1989; Edwards, 1991)

Se ha propuesto que la estructura antigénica de esta proteína consiste en dos subunidades estructurales independientes, ambas subunidades contienen epítopos que reaccionan con anticuerpos monoclonales. Con cualquiera de estas subunidades proteicas por separado se han obtenido respuestas inmunes protectoras frente al reto con cepas virulentas de PPC, refiriéndose éstas como útiles en la elaboración tanto de vacunas como de medios diagnósticos diferenciales. (Edwards, 1991; Hulst, 1994).

2.6 Replicación de pestivirus.

La replicación de los pestivirus se inicia a partir de la penetración de la célula por endocitosis seguida por la liberación del genoma viral en el citosol. Se sugiere, que para la interacción inicial y la subsecuente endocitosis debe ocurrir una interacción entre la E2 y un receptor celular de 50 kDa. (Xue, 1993) La segunda fase del ciclo de replicación se inicia con la liberación del ARN viral, en forma de un complejo de ribonucleoproteína en el citosol de la célula. El complejo se pone en contacto con los ribosomas y los factores de iniciación de la traducción son reclutados por el dominio no codificante de la región 5'. (Bouma,1999)

Una vez que se producen las enzimas virales necesarias para la replicación del ARN por la traducción del genoma, el ciclo de vida viral entra en la fase de replicación de su genoma. Con el empaquetamiento del ARN progenie y el ensamblaje de los viriones que ocurre en el retículo endoplásmico o en el complejo de Golgi, donde los viriones adquieren una envoltura lipídica, el ciclo entra en su etapa final. Los virus alcanzan el compartimiento extracelular por transporte vesicular (exocitosis) a las 10 horas post-infección.

3. Relaciones entre Pestivirus.

Los miembros del género Pestivirus están muy relacionados entre sí. (Paton, 1995) La apreciación de que constituían un grupo antigénicamente relacionado, provino de la observación histórica de Darbyshire en 1960 de que el VPPC formaba una línea de identidad con el VDVB en ensayos de inmunodifusión doble. Posteriormente, se comprendió que el VDVB de los ovinos se encontraba también muy relacionado. (Hernández, 1987; Wensvoort, 1989)

Las comparaciones de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de algunos Pestivirus, han revelado entre un 66% y un 85% de homología, respectivamente. Esta alta homología indica una similitud elevada en cuanto a la organización del genoma y al procesamiento de la poliproteína, un alto grado de conservación y por tanto, una similitud funcional de las respectivas proteínas (Fig. 2) (Moormann, 1996, Stark, 1990).

Como resultado de esta elevada homología, los antisueros policlonales contra los Pestivirus son incapaces de distinguir especies, cepas o aislados cuando se emplean en técnicas de Inmunodifusión o Inmunofluorescencia. Fue a través de ensayos de neutralización cruzada que se establecieron evidencias de esta diversidad antigénica y éstos fueron los únicos capaces de diferenciarlos.

Sin embargo, sólo con el desarrollo de anticuerpos monoclonales contra el virus en los últimos años de la década de los 80, fue posible definir la variabilidad con mayor precisión. Muchos grupos han referido anticuerpos monoclonales con especificidad, los que detectan epítopes altamente conservados, que han sido encontrados en células infectadas con todos los Pestivirus ensayados. La mayoría de ellos están dirigidos contra la proteína no estructural designada p125/80 (NS3 en el VPPC). (Paton, 1995)

Los anticuerpos monoclonales que reaccionan solo con cepas de PPC y con ninguna de las de los Pestivirus de rumiantes, están dirigidos contra los dominios antigénicos de la proteína E2. (Wensvoort y col., 1989).

4. Respuesta inmune al VPPC.

Los cerdos que se recuperan de la infección del VPPC desarrollan anticuerpos contra PPC que persisten por un tiempo prolongado. Los anticuerpos séricos que neutralizan el virus aparecen en los animales que se recuperan entre los 14 y 28 días posteriores a la infección. Solo es posible detectar antígeno y anticuerpo de forma simultánea en la sangre durante períodos prolongados en los casos de infección crónica. Las células infectadas con el virus, transfieren anticuerpos a través del calostro a sus crías. Estos anticuerpos tienen una vida media aproximada de 14 días y pueden proteger a los cerditos contra una infección fatal, durante las primeras 5 semanas de vida. Los fetos porcinos alcanzan la inmunocompetencia alrededor de la mitad de la gestación. (Merck, 2000).

Sin embargo, los anticuerpos neutralizantes frente al VPPC solo se forman en la fase terminal del desarrollo fetal

Los cerdos infectados congénitamente, en dependencia del tiempo de gestación de la cerda, pueden ser abortados, momificados, nacer muertos o débiles, morir poco después de nacidos o nacer aparentemente sanos en cuyo caso pueden estar persistentemente infectados y raramente producen anticuerpos específicos al virus. (Frías et al., 2003)

Debido a que estos animales tienen una respuesta inmune normal a antígenos no relacionados a PPC, la falta de respuesta es explicada como una tolerancia inmune específica. (Van Oirschot, 1983)

La trombocitopenia acompaña normalmente a la linfopenia, de hecho a veces precede a la reducción drástica de los linfocitos sanguíneos periféricos. Es posiblemente originada, entre otras causas, por el amplio crecimiento del virus en el endotelio vascular, el que lleva a congestión, hemorragia, infartación y necrosis. (Ressang, 1973)

Recientemente se ha demostrado que las funciones inmunes de los linfocitos T periféricos son eliminadas tempranamente, entre los 3 y 5 días después de la infección, aún antes de la detección del Antígeno viral (Pauly et al, 1995). Los resultados de estos estudios recientes indican que el VPPC virulento suprime los mecanismos de inmunidad tanto celular como humoral.

4.1 Respuesta inmune humoral.

Los anticuerpos (Acs) que aparecen después de la infección natural están dirigidos contra dos proteínas estructurales (E2 y Erns), y contra una proteína no estructural (NS3 o p80). (Paton et al 1995 y König et al, 1995). Los Acs contra las proteínas E2 de la envoltura neutralizan el virus *in vitro* e inducen una respuesta inmune protectora (Hulst 1993). La inmunización del cerdo con la proteína Erns no induce Acs neutralizantes que sean detectados, pero suministra protección parcial frente al reto con el VPPC virulento (Rumenapf, 1991; König et al 1995).

La aparición relativamente tardía de los Acs en los cerdos convalecientes indica que el virus de la PPC impide los mecanismos de inmunidad humoral, posiblemente por la infección de los linfocitos B (Susa et al, 1992).

A partir del día 10 después de la infección, tanto los linfocitos T como los B se infectan con el VPPC y en una fase terminal de la enfermedad ocurre una depleción de las células CD4⁺ y CD8⁺ en linfocitos T de sangre periférica, (Susa et al, 1992; Pauly et al 1995).

4.1.1 Anticuerpos Neutralizantes y Protección.

Debido a la capacidad inmunosupresora del VPPC, la aparición de los Acs séricos en los animales recuperados no ocurre al menos hasta los 14-28 días después de la infección (Ressang, 1973).

Los Acs con mayor actividad neutralizante están dirigidos contra la glicoproteína E2. La glicoproteína estructural Erns induce Acs en cerdos (Konig et al 1995). Por otra parte, Tanto la E2 como la Erns desempeñan un papel muy importante en la adsorción del virus a la superficie celular (Schneider et al 1993; Moorman, 1993). Los Acs dirigidos contra Erns y NS3 tienen baja actividad neutralizante (Weiland 1992 y Konig et al 1995).

4.2 Respuesta inmune celular.

La vacunación de los cerdos con cepas Lapinizadas del virus de la PPC, los protege del desafío letal, antes que los Acs neutralizantes contra el VPPC aparezcan. Esto sugiere el posible papel protector de un componente de la inmunidad celular.

Se ha identificado un sitio antigénico importante para los linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos del VPPC, cercano al sitio de ruptura entre dos proteínas no estructurales: NS3 (p80) y NS4a (p10), y se evidencio que la actividad citotóxica específica estaba mediada por linfocitos T restringidos al Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH). (Pauly y col., 1988)

5. Signos clínicos y lesiones de la PPC.

El virus penetra al organismo por ingestión, inhalación o a través de la piel. El contacto genital natural como el artificial (inseminación) puede propiciar también la infección. Una vez en el organismo el virus infecta las células epiteliales de las criptas de las tonsilas, órgano diana para la replicación primaria del virus independientemente de la vía de infección. (Ressang,1973)

A partir de las tonsilas y utilizando los vasos linfáticos, el virus llega a los ganglios linfáticos regionales, pasa a la sangre dando lugar a una viremia que facilita su diseminación a otros órganos linfáticos, lo que provoca una nueva replicación del virus. Esta viremia comienza de 14-24 horas después de la infección y puede durar hasta poco antes de la resolución de la enfermedad. (Fig. 3). (Van der Molen, 1981)

Las hemorragias múltiples que se producen se deben a la degeneración del endotelio vascular, junto a una pronunciada trombocitopenia y a la alteración de los mecanismos de coagulación de la sangre. También la infección del endotelio vascular causa edema e inflamación, lo que produce obstrucción del flujo sanguíneo e infartos. Los macrófagos infectados tienen actividad linfoestimuladora

y una elevada producción de prostaglandina E2, esto último pudiera relacionarse con los trastornos de coagulación. (Knoetig, 1999)

Los cerdos infectados con PCC pueden desarrollar un espectro amplio de signos clínicos, con alta morbilidad y mortalidad. (Liess, 1992; Van Oirschot, 1992) Además, están descritas las infecciones subclínicas o inaparentes (portadores asintomáticos), que dificultan el diagnóstico y contribuyen a la diseminación de la enfermedad.

El periodo de incubación de la enfermedad puede variar de 5 a 15 días, durante el cual ya el virus comienza a eliminarse a través de las secreciones y deyecciones de los animales infectados. (Van Oirschot, 1992)

Existen numerosas formas de manifestación de la enfermedad:

- ❖ **Forma hiperaguda o sobreaguda:** Se presenta en cerdos susceptibles no vacunados y casi su único signo es la muerte en los primeros 5 días después de la infección. Al practicarse la necropsia se observan signos de congestión aguda generalizada.

- ❖ **Forma aguda:** Alta morbilidad y mortalidad, entre los 10 y 20 días después de la infección. Se caracteriza por fiebre alta hasta más de 41°C, depresión, inapetencia, enrojecimiento de la piel que evoluciona hasta la cianosis de las orejas, el hocico, el abdomen y la zona medial de las extremidades, signos nerviosos (temblores, marcha ondulante, andar en “punta de ballet”, posición “sentado”, caída del tren posterior, “pedaleo”), conjuntivitis catarral con abundantes secreciones (legañas), descargas nasales y constipación seguida de diarrea de color amarillo a rojizo (hemorrágica). (Stewart, 1981)
En la necropsia se observan hemorragias petequiales (puntiformes) en casi todos los órganos. Se observan zonas de necrosis en tonsilas. Los infartos marginales del bazo aparecen bien delimitados y de color pardo oscuro. Los ganglios linfáticos del cuello, ingle, mesentéricos, renales y gastrohepáticos pueden aparecer congestionados, hemorrágicos o aumentados de tamaño.

- ❖ **Forma subaguda:** Las manifestaciones clínicas son similares a las de la forma aguda, pero menos dramáticas y más prolongadas. La muerte sobreviene entre los 20 y 30 días posteriores a la infección. (Frías, 2003)

- ❖ **Forma crónica:** El curso es lento y se prolonga más de 30 días, con períodos intermitentes de fiebre y viremia. Se manifiesta por decaimiento, retraso del crecimiento, apetito variable y conjuntivitis con párpados adheridos por secreciones purulentas. Además, se presentan signos respiratorios o neurológicos. (Dunne, 1975; Frías, 2003)

- ❖ **Forma congénita:** el virus de la PPC atraviesa la barrera transplacentaria produciendo abortos, momificaciones, nacidos muertos, débiles o con temblores (mioclonias), o nacimientos de cerdos aparentemente sanos que desarrollan la enfermedad y no producen anticuerpos específicos contra el

virus. Estos cerdos inmunotolerantes no son detectados por pruebas serológicas y resultan importantes desde el punto de vista epizootológico, participando como reservorio al facilitar la supervivencia del virus y el mantenimiento de la circulación en la piara. (Merck, 2000; Frias, 2003)

6. Diagnóstico.

La variabilidad de signos clínicos y lesiones no suministran una evidencia para un diagnóstico inequívoco de PPC, por lo tanto debe ser confirmada por investigaciones de Laboratorio. (Tuero, 1995 y Sánchez, 1998).

Ante la presencia de signos en la piara que haga sospechar de PPC, debe inmediatamente realizarse el diagnóstico clínico-epizootológico, en el cual debe insistirse en el recuento de leucocitos en sangre de los cerdos afectados, ya que la leucopenia es un signo presente en la PPC.

6.1 Diagnóstico diferencial.

Por la similitud del cuadro clínico y anatomopatológico con otras enfermedades del cerdo, la PPC requiere del diagnóstico diferencial (OIE ,2000) del laboratorio con relación a otras enfermedades como:

- ❖ Peste Porcina Africana (PPA).
- ❖ Diarrea Viral Bovina (DVB)
- ❖ Erisipela.
- ❖ Salmonelosis.
- ❖ Pasteurellosis.
- ❖ Estreptococosis.
- ❖ Leptospirosis.
- ❖ Intoxicaciones con cumarínicos.

De forma general el diagnóstico bacteriológico definitivo con aislamiento de valor en ausencia de un diagnóstico de laboratorio positivo de PPC induce a pensar en alguna de las enfermedades de origen bacteriano, aunque el diagnóstico de éstas no descarta la participación del virus PPC ya que muy a menudo se ven asociadas.

6.2 Diagnóstico de Laboratorio.

El método clásico para la detección de antígenos virales es la Inmunofluorescencia Directa (IFD). Es una técnica rápida y sencilla que utiliza un conjugado de fluoresceína, preparado a partir de anticuerpos policlonales, que no distingue entre los antígenos de diferentes Pestivirus. (Frias, 2003)

Los cerdos infectados con el virus BVD pueden dar resultados falsos positivos, ya que las infecciones congénitas con este virus pueden causar signos clínicos y lesiones patológicas indistinguibles de las causadas por PPC crónica. Actualmente,

está disponible un panel de anticuerpos monoclonales que permite la diferenciación de Pestivirus, aunque éstos no se emplean ampliamente.

El aislamiento en cultivos celulares, aceptado como estándar de oro, es usado rutinariamente para permitir la posterior caracterización del aislado con anticuerpos monoclonales. Es un método más sensible, pero más lento que el diagnóstico por inmunofluorescencia en cortes de órganos y requiere facilidades de cultivo de tejidos y de contención para el trabajo con cepas virulentas.

El aislamiento por inoculación en animales es muy sensible pero es costoso, consume mucho tiempo y requiere de facilidades adecuadas para la tenencia de los animales. La infección es confirmada por reaislamiento del virus en cultivos celulares.

-Ensayos para la detección del virus y sus componentes.

Detección	Método Diagnostico	Muestras	Ejecución	Requerimiento
Virus	Aislamiento viral en cultivo de tejidos en línea celular sensible	Macerados de órganos	7–21 días	Facilidades para cultivo de tejidos
	Inoculación intramuscular en cerdos (IM)		10–21 días	Tenencia de animales
Proteínas y ácido nucleico	-Inmunohistoquímicos [IFD y tinción directa con inmunoperoxidasa (IPD)]	Cortes de órganos y cultivo celular.	3–5 horas	IFD: Microscópico de fluorescencia
	-Inmunoenzimático (ELISA)	Macerados de órganos, sangre, plasma y suero.	4–5 horas	Juego de diagnóstico comerciales y facilidades de laboratorio.
	Moleculares - RT-PCR (reacción de la transcriptasa inversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa.) - RT-PCR tiempo real - Secuenciación	Macerados de órganos, sangre, plasma, suero y cultivo celular infectado.	4 horas 1–2 horas 3 días	Equipamiento, infraestructura y personal adecuado para asumir alta tecnología.
Anticuerpos vs. virus y proteína	Inmunohistoquímico. -Neutralización de peroxidasa (NPLA) -Neutralización de la fluorescencia (NIF).	Suero	3 días	Facilidades para el cultivo de tejidos NIF: Microscopio fluorescente
	-Inmunoenzimático (ELISA)		4– 5 días	Juegos de diagnósticos comerciales y facilidades de laboratorio

7 Estrategias de vacunación contra la PPC.

La mayoría de los programas de erradicación de PPC en áreas enzoóticas están basados en la vacunación de los cerdos.

Las vacunas contra PPC que se han empleado son de tipo vivo modificado y de virus inactivado. Las vacunas inactivadas se dejaron de utilizar por ser inmunógenicamente muy débiles y porque producían foco de infección por virus virulento residual y ser poco efectivas en presencia de anticuerpos calostrales. (Aynud et al. 1988).

Las vacunas de virus vivo modificado son derivadas del virus tipo salvaje y se obtienen por pasajes seriados en conejos (Lapinizado) o por selección de cepas atenuadas en cultivos celulares. (CFR-9, 2000) Las cepas C, la GPE-, la Thiverval y la PAV-250 son actualmente las cepas vacunales más efectivas, con estabilidad genética, que transmiten inmunidad a los cerditos a través del calostro y garantizan una inmunidad alta, rápida y duradera (Horsch, 1995).

Sin embargo, si los brotes ocurren en países con una fuerte industria porcina y tienden a prolongarse, la vacunación por zonas geográficas puede ser necesaria para la erradicación final. Esto es aplicable a los países que aún siendo libres de PPC mantengan el virus circulando en poblaciones de jabalíes, en los cuales las vacunas contribuyen a impedir la diseminación a los cerdos domésticos en las áreas vecinas.

En estos casos, sería ventajoso que las vacunas, además de impedir la diseminación del virus, permitieran la diferenciación entre animales vacunados e infectados. Estos son los llamados ensayos con vacunas marcadoras o DIVA (Differentiate Infection from Vaccination Assay). (CFR-9, 2004)

A partir de 1951 se comenzó la aplicación de vacunas vivas atenuadas, a partir de animales (conejos) y en cultivos celulares, induciendo una respuesta inmune parecida a la infección natural.

Estas han sido muy exitosas en programas de erradicación y control en muchos países.

Entre las vacunas vivas atenuadas de más amplio uso se hallan:

- ❖ Adaptadas y multiplicadas en conejos con la Cepa China Lapinizada
- ❖ Adaptadas y multiplicadas en cultivos celulares
- ❖ Cepa China en RK-13, mediante clonación de células infectadas
- ❖ PAV 250: PK-15.
- ❖ CAP: IBRS-2.
- ❖ GPE: Cobayo.
- ❖ IFFA/A49: Cobayo y Cordero.
- ❖ Thiverval: PK-15.

Los países que utilizan vacunas contra la PPC tienen la responsabilidad de garantizar estatalmente los controles de calidad exigidos por la OIE para este tipo de producto y no deben permitir el uso de vacunas que lo evadan. (CFR-9, 2000)

8 Cultivos Celulares y sus aplicaciones en Virología.

El cultivo celular o cultivo de tejido tiene su origen en el siglo XIX. Estas técnicas se iniciaron con el cultivo de fragmentos no disgregados de tejidos, los cuales restringían la mitosis de las células cultivadas y por tanto su crecimiento.

Después se realizaron cultivos con fragmentos disgregados de tejidos, los cuales aumentaban el crecimiento celular en cultivo, ya que se utilizaban células dispersas, esto fue un gran avance y provocó una explosiva expansión en esta área desde los años 50 del pasado siglo. (Reina, 2002).

Este procedimiento fue utilizado durante mucho tiempo por un pequeño grupo de investigadores. Su uso era limitado por la dificultad de brindarle a las células un medio adecuado y de prevenir la contaminación bacteriana y micótica. Con el uso de los antibióticos y antimicóticos y la inclusión de medios nutrientes se resolvió el mantenimiento de los medios de cultivos celulares y se dio un gran paso de avance en la Virología. (Skalka; 1971)

Los cultivos celulares se utilizan en Virología con muchos fines, entre ellos el aislamiento e identificación de los virus; la titulación de virus y antisueros y el cultivo masivo de los virus para la producción de diferentes preparados biológicos como vacunas y antígenos. (Larski, 1989)

Por las razones anteriores, se plantea que el cultivo celular representa el mejor sistema que existe actualmente para el cultivo de virus, siendo un arma de extraordinario valor para el diagnóstico de laboratorio y un procedimiento más económico que el empleo de animales y huevos embrionarios; resultando el trabajo más uniforme.

Existen tres tipos principales de células cultivadas:

- ❖ Cultivos Primarios: obtenidos por la tripsinización de los fragmentos de tejidos embrionales o adultos; poseen como limitante el tener una vida limitada.
- ❖ Cultivos Secundarios: Son obtenidos a partir de cultivos primarios.
- ❖ Cultivo de células de línea: término establecido en año 1966 por la Asociación de Cultivos de Tejidos, surgen de un cultivo primario, a la vez que se realice el primer subcultivo y puede decirse que queda establecida cuando se demuestra la potencialidad de ser subcultivada indefinidamente *in vitro* al menos 70 veces con intervalos entre los subcultivos de 3 días.

Las líneas celulares en Virología son muy utilizadas por su capacidad de cultivarse y almacenarse por tiempo ilimitado y por resistir el crecimiento de un gran número de virus. Presentan gran ventaja sobre los cultivos primarios ya que son más económicas, fáciles de transportar, están libres de virus extraños, y se puede preparar cualquier cantidad de acuerdo al trabajo a realizar. (Reina, 2002)

Es por ello que en el presente trabajo ha sido considerado el estudio de la adaptación de la cepa China Lapinizada a la línea celular RK-13 para obtener un Virus Semilla Maestro (VSM) que permita obtener una vacuna contra la P.P.C.

Capítulo 2 Materiales y Métodos

2.1 Equipamiento y materiales generales empleados en la Investigación.

2.1.1 Materiales.

- Frascos Roux de 25 cm², 75 cm², 225 cm².
- Frascos Roller 2L.
- Lápiz cristalográfico.
- Criotubos.
- Pipetas Serológicas.
- Jeringuillas de 5 y 10 mL
- Micropipetas Eppendors.
- Pinzas de dientes ratón.
- Portaobjetos y Cubreobjetos.
- Tubos serológicos.
- Laminillas de cristal.
- Cámara de Newbauer.
- Bulbos de 10 mL.
- Ropa bacteriológica.
- Guantes de cirugía.
- Tapones de goma.
- Gasas.
- Mechero de gas.
- Flujo laminar.
- Caja de poliespuma.
- Membranas filtrantes de nitrocelulosa. (0,1 µm; 0,22 µm; 0,8 µm). (Sartorius, Alemania).
- Nitrógeno Líquido.

2.1.2 Equipos

- Microscópio óptico de lente invertido. ID 30 (ZEISS, Alemania.)
- Microscopio Fluorescente. (ZEISS, Alemania.)
- Incubadora LP 103. (Hungría).
- Nevera de 2 a 8 °C. Criolla. (Cuba).
- Liofilizador de Ampulas. (STOKES, EU.)
- Liofilizador de Bulbos. (BONAPACE, EU.)
- Autoclave Vertical GP 360. (Rusia)
- Congelador. (QUICKFREZ, Canadá.)
- Equipo de Ultrafiltración (AMICON. EU.)
- Filtro de superficie plana. (SARTORIUS, Alemania)
- Centrifuga. T-23. (Alemania).

2.1.3 Reactivos

- ❖ Gentamicina. (Yantay, China).
- ❖ Bicarbonato de sodio. (Sigma, EU.)
- ❖ Etanol. (Cuba)
- ❖ Tripsina. (Sigma, EU.)
- ❖ Acido Etilendiaminotetraacético (EDTA). (Sigma, EU)
- ❖ Cloruro de Sodio. (Quimipur, España.)
- ❖ Cloruro de Potasio. (Merck, Brasil)
- ❖ Hidrogeno fosfato de Sodio. (BDH, Inglaterra)
- ❖ Hidrogeno fosfato de potasio. (Merck, Alemania)
- ❖ Penicilina. (Sigma, Alemania)
- ❖ Estreptomina. (Sigma, Alemania)
- ❖ Acetona. (Merck, Alemania)
- ❖ Glicerina. (BDH, Inglaterra)
- ❖ Tripán Azul. (BDH, Inglaterra)
- ❖ Conjugado policlonal anti-PPC. (AD. L-3, Holanda)
- Conjugado monoclonal anti-VDVB. (Holanda)

2.1.4 Soluciones

Se preparan en el Departamento de Bioquímica de la Empresa LAPROVIR # 7, según los PNO correspondientes:

- ❖ Solución de bicarbonato de sodio 7,5%. (PNP, código: -08-009, 3ra. Ed)
- ❖ Solución de etanol al 70%. (PNO, código: 7-08-010, 3ra. Ed)
- ❖ Solución Tripsina-Versene (T/V). (PNO, código: 7-08-012, 3ra. Ed.)
- ❖ Solución Salina Tamponada con Fosfatos (PBS).(PNO, código: 7-08-025, 3ra.Ed)
- ❖ Combiótico al 10%. (PNO, código: 7-08-004, 3ra. Ed)
- ❖ Solución Timerosal de sodio al 0,01%. (PNO, código: 7-08-017, 3ra. Ed)
- ❖ Solución Formaldehído al 0,5%. (PNO, código: 7-08-015, 3ra. Ed)
- ❖ Estabilizadores (Bajo cláusula de confidencialidad)
- ❖ Solución de Azul de Evans. (PNO, código: 7-08-022, 3ra. Ed).

2.1.5 Sustrato Celular y medios para los cultivos celulares.

- ❖ Sustrato celular
Línea celular RK-13 derivada del subcultivo 198, procedente de la ATCC. y depositada en el Departamento de Cultivo celular de la Empresa LAPROVIR # 7 (LABIOFAM).
- ❖ **Sueros**
Suero Fetal Bovino (SFB). (Hy Clone, EU).
- ❖ **Medios**
Medio de cultivo: Medio Mínimo Esencial Eagle (MEM-A).

- ❖ Medio de congelación: Medio MEM-A (70%), con Dimetilsulfoxido (DMSO) (10%) y Suero Fetal Bovino (2%).

2.2 Animales

- ❖ Cerdos seronegativos, machos y hembras de 25 a 30 kg. de peso, procedentes del Centro "El Rosario" (Matanzas), mantenidos en un área controlada con buen estado higiénico-sanitario y una alimentación adecuada.
- ❖ Conejos machos o hembras sanos, de la raza mestiza, de 2,2 a 2,7kg de peso corporal, procedentes de UPALAB (LABIOFAM), los cuales fueron mantenidos en un local cerrado con buen estado higiénico sanitario, a temperatura ambiental y alimentación adecuada para la especie.

2.3 Inmunógeno

- ❖ Fue utilizada la cepa China Lapinizada, adaptada a la línea celular RK-13, (pasaje 20 de la adaptación), procedente del Departamento de Cepas y Semillas de la Empresa LAPROVIR #7, del Grupo Empresarial LABIOFAM.

2.4 Métodos

2.4.1 Evaluación de la calidad de la línea celular RK-13, utilizada como sustrato celular. [Código Federal de Regulaciones -9 (CFR-9)].

2.4.1.1 Pureza

La prueba se realiza en el departamento de Control Interno de la Empresa LABIOFAM mediante el PNO: Ensayo de sterilidad por el Método de Ensayo. Siembra Directa. Código 8-03-003.

- i) Detección de contaminantes bacterianos.

Se limpia la superficie exterior de los criotubos con alcohol al 70% y se accede al contenido de manera aséptica.

Se removió el líquido de los envases con una jeringuilla estéril y aguja. Se transfirió asépticamente 1 mL de la muestra a evaluar (Línea celular RK-13) a un tubo de medio de cultivo para mezclar el líquido con el medio.

La mezcla se incubó por 14 días con medio Tioglicolato fluido de 30-35°C procedente del Centro Nacional de Biopreparados, la Habana (BIOCEN). Se examinó visualmente en los medios de cultivos sembrados el crecimiento de gérmenes contaminantes, tomando como criterio la presencia de turbidez en el medio.

ii) Detección de contaminación por hongos.

Se procedió de igual forma que en i) utilizando el medio digerido de soya de procedencia BIOCEN, e incubándose a una temperatura de 20-25°C durante 14 días. Se examina el crecimiento a través de la presencia de turbidez en el tubo.

iii) Detección de contaminación por Micoplasmas.

La prueba de detección de micoplasmas se realizó según el PNO Determinación de Micoplasma en el Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri (IPK).

La presencia de colonias típicas de micoplasmas en alguna de las placas indica resultados positivos de contaminación.

Este ensayo se corroboró en el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA)

iv) Detección de agentes hemoadsorbentes.

A las monocapas (25cm²) de células a ensayar previamente lavadas con PBS, se adicionaron volúmenes adecuados de una suspensión de eritrocitos lavados de cobayo al 0.2% que cubriera uniformemente la superficie de la monocapa celular. Se incubó la monocapa durante 30 minutos a 4°C. Se lavó nuevamente con PBS y se examinaron al microscopio óptico, para observar la hemoadsorción.

De no haber hemoadsorción aparente, se repite la técnica incubándose la monocapa entre 20-25°C 30 min. Se lavó con PBS y se examinaron de nuevo las monocapas al microscopio para verificar la hemoadsorción. Si aparece esta se considera como no satisfactorio.

v) Detección de agentes extraños.

Al final del período de mantenimiento se evaluaron las monocapas, para verificar la presencia de agentes extraños congelando y descongelando las monocapas tres veces. Se centrifugaron las células rotas a 2000 rpm, por 15 minutos, para remover el detritus celular. Se tomó el sobrenadante y se dividió en alícuotas iguales, dispensándose 1 mL en cada monocapa (75 cm²) de las siguientes líneas celulares: Vero, RK-13 y MDBK.

Se mantuvieron las monocapas durante 14 días, en incubación a 37 °C. Se subcultivaron las monocapas una vez transcurrido este tiempo se observó durante 14 días, para detectar el posible efecto citopatogénico.

2.4.1.2 Requisitos Generales

1. Se realizó un registro completo de la línea celular, con los siguientes aspectos: Historia de pases, Fuente, medio de propagación y de congelación usados.

2. Se estableció el Banco de Células Maestro (BCM) y Banco de Células de Trabajo (BCT) a un nivel de pase determinado, manteniendo las células congeladas en Nitrógeno Líquido en alícuotas de 1 mL. Para obtener los BCM se descongeló un ampulla del pase 198 de la línea celular RK-13 (PNO. Descongelación Celular. Código: 7-08-019/00) y el BCT se obtuvo a partir del subcultivo de un ampulla del BCM, según el PNO. Confección de BCM y BCT, código 07-08-064, del Departamento de Cultivos Celulares de la Empresa LAPROVIR # 7

3. Se monitoreó en cada lote de células las características normales como:

- ❖ Apariencia microscópica.
- ❖ Velocidad de crecimiento.
- ❖ Producción ácida
- ❖ Eficiencia de planteo: Aproximadamente el 39 %.

2.4.2 Determinación de la presencia del antígeno vacunal por IFD en la Línea Celular RK-13

Se tripsinizaron 4 frascos Roux de 225 cm² cubiertos con monocapas de la línea celular RK-13, separando las células de las paredes del frasco y suspendiéndolas en un frasco de 50 mL de volumen. Se tomó 1ml de la cepa China adaptada al cultivo celular y se mezcló con 1 mL de células suspendidas, conteniendo 10⁶ cel/mL, según el conteo realizado en la cámara de Neubauer. (PNO. Conteo Celular con Cámara Neubauer. Código: 7-08-036/00).

Esta mezcla se depositó en 4 frascos Roux nuevos, a razón de 0.25 mL de suspensión por frasco, los que fueron incubados posteriormente a 37⁰C durante 5 días. Este procedimiento se repitió en dos pasajes siguientes y se realizó el control de esterilidad a cada uno de ellos, sembrándolos en caldo Tioglicolato de sodio y caldo soya triptona, incubándolos durante 14 días a 30- 35⁰C y 20-25⁰C, respectivamente. A los 5 días, del tercer pasaje se almacenaron los frascos Roux en un congelador a -20⁰C, hasta conocer el resultado de los controles de esterilidad.

A los 15 días post-congelación se procedió a la mezcla de los 4 frascos Roux y se tomaron muestras para determinar la concentración viral, llevando nuevamente a congelación el producto.

Se realizaron diluciones de 10⁻¹ a 10⁻⁵ de la muestra tomada y mediante cocultivo con células RK-13 vírgenes, se sembraron en tubos en una gradilla a razón de 2 réplicas por cada dilución. En el interior de cada tubo se colocó una laminilla de cristal, para facilitar la fijación de las células. Los tubos se incubaron a 36⁰C durante 5 días.

Pasados los 5 días de incubación de la gradilla, se eliminó el medio de los tubos y se realizaron tres lavados, dos con PBS pH 7,2 y uno con agua destilada, de cinco

minutos de duración cada uno. Posteriormente se separaron las laminillas de los tubos y se colocaron en portaobjetos, para fijar las células con acetona pura durante 10 minutos a -20°C . Luego se le añadió a cada una de las laminillas 20 μL del conjugado policlonal anti-PPC marcado con FITC incubándose a 37°C por 1 hora, en cámara húmeda, lavándose después tres veces con PBS por 10 min. y con agua destilada 1 min. Se contrastó con Solución Azul de Evans 1:400 durante 7 minutos y se eliminó el colorante con agua destilada. Se aplicó Glicerina Tamponada y se colocó el cubreobjetos. Se procedió a la observación del inmunocomplejo en el Microscopio fluorescente para determinar por Inmunofluorescencia Directa (IFD) el título viral según los cálculos de Reed-Muench. (PNO: código: 8-02-050).

2.4.3 Ultrafiltración del antígeno vacunal.

Con los resultados del título viral por Inmunofluorescencia Directa del pasaje # 20 y las referencias relacionadas con la adaptación de la cepa China Lapinizada de la PPC en la Línea Celular RK-13 infectada, la cual comenzó a presentar efecto Fluorescente a partir del pasaje # 8, con el aumento de la concentración viral en los pasajes 11 al 20 y manteniendo igual título viral del pasaje 14 al 20, se decidió ultrafiltrar el antígeno vacunal con el objetivo de aumentar su concentración dos logaritmos por encima del obtenido hasta el momento. (PNO, código: 7-08-060)

- ❖ Procedimiento para ultrafiltrar
 - Se lavó de 2 a 3 veces el reservorio, con 2 L de agua destilada, para eliminar restos de solución preservante.
 - Se enciende el equipo y se regula la velocidad de filtrado para que no exceda al máximo de presión permitida de 25 psi.
 - Se concentró la masa viral 10 veces y se recobró el producto. Se almacenó a -20°C , hasta la realización de los controles de calidad.

2.4.3.1 Determinación por Inmunofluorescencia del Título viral del Antígeno concentrado.

El antígeno viral concentrado fue inoculado en células RK-13 vírgenes, en diluciones de 10^{-1} a 10^{-5} y sembrados en tubos de cultivo en una gradilla, a razón de 3 tubos por dilución, que tiene en su interior laminillas de cristal, incubándose a 36°C durante 5 días. El resto del procedimiento es similar al descrito en el acápite 2.4.2

2.4.4 Liofilización del Antígeno vacunal.

Este estudio se llevó a cabo con el fin de observar el comportamiento de los estabilizadores empleados, en cuanto a preservación y estabilidad del producto.

La masa viral concentrada se liofilizó en el equipo de Liofilización de ampulas, según el procedimiento establecido (PNO, código: 7-06-099).

Para ello, se hizo una mezcla de 50 % del antígeno vacunal concentrado y 50 % de los estabilizadores. El producto fue envasado a razón de 1 mL/ámpula.

Al final del proceso de liofilización debe aparecer en el fondo del ámpula una película en forma de cáscara.

2.4.4.1 Evaluación de la pureza del VSM

Se inocularon 10 cerdos de 45 kg. de peso y buen estado de salud, con 10 dosis del virus concentrado liofilizado por vía intramuscular (VI). Se repitió la inoculación por la misma vía de aplicación e igual cantidad de dosis a las tres semanas post inoculación.

A las dos semanas post inoculación se les realizó extracción de sangre con agujas californias, previamente esterilizadas. Se les extrajo 5 mL de sangre sin anticoagulantes por la vena interna del ángulo del ojo. Esta fue depositada en tubos de cultivo, los que se taparon y rotularon. La sangre se mantuvo en reposo 2 horas a una temperatura de 37 °C, para facilitar la retracción del coagulo y posteriormente a la temperatura de 2 - 8 °C durante toda la noche para permitir su máxima retracción. Al día siguiente se decantó el suero y luego se centrifugó a 2500 r.p.m., durante 15 minutos. Todos los sueros se decantaron y se colocaron en tubos serológicos nuevos los que fueron almacenados a -20 °C hasta su utilización.

El suero fue testado por Inmunofluorescencia indirecta (IFI) para detectar la presencia de antígenos del virus de la enfermedad de DVB. La técnica es muy similar a la descrita en el acápite **2.4.2**, pero en vez de usar el conjugado policlonal anti-PPC, se utiliza 20 µL de un conjugado monoclonal anti-VDVB, se realizan los lavados correspondientes con PBS y agua destilada y a continuación se fija una inmunoglobulina anti-especie incubando a 37°C por espacio de 30 min. Se continuando con el procedimiento referido anteriormente.

2.4.4.2 Inocuidad del VSM.

La prueba se realizó en el Laboratorio de Control Estatal (LCC) del Instituto de Medicina Veterinaria (IMV)

Se utilizaron 3 cerdos seronegativos y se inocularon intramuscularmente con 10 dosis del antígeno vacunal liofilizado. Los cerdos fueron observados durante 3 semanas y sus temperaturas corporales fueron tomadas diariamente mediante termometría rectal durante la primera semana.

Ningún cerdo debía morir o presentar signos de la enfermedad atribuibles al antígeno vacunal. El promedio diario de temperatura corporal no debe alcanzar los 40,5°C o más y los cerdos deben crecer normalmente.

2.4.4.3 Evaluación de las DP₅₀ del VSM mediante la prueba de Potencia.

La potencia es expresada como el número de DP₅₀ contenidas en una dosis de vacuna.

La prueba se realizó en el Laboratorio de Control Estatal (LCC) del Instituto de Medicina Veterinaria (IMV).

Dos grupos de 10 cerdos de 6 a 8 semanas de edad fueron inoculados intramuscularmente con diluciones 1/40 y 1/160 del antígeno vacunal liofilizado, respectivamente. Se dejaron cinco cerdos sin vacunar como controles. A las 2 semanas post vacunación los cerdos vacunados junto con los controles fueron retados intramuscularmente con 10⁵ Dosis Infeccivas Media (DI₅₀) de una cepa virulenta del virus de la PPC y fueron observados durante dos semanas a partir del reto y en este período los controles debían morir. De los cerdos que sobrevivieron sin presentar ninguno de los síntomas de la PPC, se calculó mediante el procedimiento de Reed–Muench, el número de DP₅₀ contenido en el antígeno vacunal, cuyo resultado debe ser ≥ 100 DP₅₀.

2.4.4.4 Evaluación de la replicación y cálculo del título viral del VSM en conejos.

Se inocularon 35 conejos mestizos, de 1.8 kg. de peso con diluciones del VSM, de 10⁻¹ a 10⁻⁵ a razón de 2 mL/dilución, por la vena marginal de la oreja y se dejaron 7 controles negativos. Se estudió la curva térmica por 7 días, tomándose tres veces al día la temperatura rectal de los animales. A los 7 días se sacrificaron los animales que tenían una curva térmica adecuada y se extrajeron los órganos dianas (bazo, ganglios mesentéricos e hígado) para su observación macroscópica. El título viral se determinó por el método de Reed – Muench. [PNO, código 8-02-050]

2.4.5 Elaboración de un lote de la vacuna en cultivo celular contra la PPC a escala de laboratorio.

Con esta finalidad se preparó el cuarto de elaboración según el PNO código: 7-02-054.

Se replicó el VSM en los 2 frascos Rollers cubiertos con una monocapa de la línea celular RK-13, que contenían 400 mL de medio de mantenimiento MEM-A, cada uno, incubándose a 36°C durante 5 días. Pasado este tiempo se tripsinizaron los dos frascos, desprendiendo las células de la pared del cristal (PNO, código 7-08-020, 3ra. Ed.) y se mezcló el líquido obtenido con células vírgenes. Esta mezcla se depositó en 4 frascos Rollers nuevos, añadiéndoles 50 mL de la mezcla y 400 mL del medio MEM-A. Se incubaron los frascos a 36°C, durante 5 días y posteriormente se congelaron durante 48 horas. Luego se descongelaron y se realizó un pool, obteniéndose 1600 mL de masa viral la que se utilizó para realizar el lote piloto.

Se mezclaron 1000 mL de esta masa viral con 50 % estabilizadores aprobados y 1% combiótico. Se realizó el envase en frascos de 10 mL, a razón de 3.2 mL/frasco y se procedió a la liofilización, utilizando el equipo BONAPACE (PNO Puesta en marcha de los equipos de Liofilización en bulbos, código 7-06-074).

Fueron valoradas las características organolépticas, el título viral por IFD y se enviaron muestras al LCE del IMV para desarrollar las pruebas de humedad residual según PNO Determinación de la Humedad Residual en vacunas liofilizadas, código: CF-MG-0005, 3ra Ed. y los ensayos de potencia e inocuidad según se describió en los acápite anteriores.

Capítulo 3. Resultados y Discusión.

3.1 Evaluación de la calidad de la línea celular RK-13, utilizada como sustrato celular.

3.1.1 Pureza

La pureza de una Línea Celular dada es una condición básica en la evaluación de su calidad para su utilización en Virología.

Horsch y Baron (1995), plantearon que dado el lento crecimiento de las células animales ante la mayoría de los contaminantes comunes como las bacterias, hongos y levaduras, las técnicas de cultivo celular necesitan las más estrictas condiciones de asepsia, partiendo de las premisas de que las células son las productoras de la materia prima de interés.

A los 14 días, los tubos sembrados para analizar la pureza de la línea RK-13 no presentaron turbidez, por lo que se demostró de este modo la ausencia de contaminantes bacterianos y fúngicos. Igualmente, se evidenció la ausencia de contaminación por Micoplasmas y no se detectaron agentes hemoadsorbentes. En las monocapas evaluadas, no se reveló efecto citopatogénico alguno, demostrándose la no presencia en ellas de agentes extraños.

Estos hallazgos confirman que la línea celular RK-13 se encontraba pura y podía ser utilizada como sustrato para la replicación del virus de la PPC.

Skalka (1971) y Larski (1989), establecieron el conjunto de riesgos a que están sujetas las líneas celulares en cultivo, señalando como importantes: la contaminación por bacterias, hongos y micoplasmas, pérdidas de genes que codifican para la síntesis de inmunoglobulinas y los costos elevados por el mantenimiento en cultivos, lo que corresponde con uno de los requisitos propuestos a medir en el protocolo de Evaluación de las vacunas de la PPC en cultivo celular.

Nuestros resultados coincidieron con los parámetros establecidos por el Código Federal de Regulaciones (CFR-9), en cuanto a la utilización de las líneas celulares, las cuales no deben presentar contaminantes, para ser utilizadas en la elaboración del antígeno vacunal.

En este sentido Pérez y Falelo (1998), investigadores del Instituto Finlay plantearon que uno de los aspectos más importantes a tener en cuenta en la producción de sustancias biológicas a partir de sustratos celulares es garantizar una fuente común para la producción. (CFR-9, 2000).

3.1.2 Requisitos Generales.

En la industria Biotecnológica es importante contar con un sistema de documentación que permita llevar a cabo el proceso de producción y control de manera reproducible y confiable (OMS, 2000).

En el trabajo con Cultivos celulares, la historia de los pases es un parámetro fundamental a tener en cuenta en estos registros, ya que permite valorar el número máximo de pases o duplicaciones de la población celular y comprobar que los cultivos sucesivos originen productos idénticos, evitando la pérdida de las propiedades que pueden originarse por pasajes sucesivos. (Adamus,1989)

En nuestros experimentos las características observadas luego de las descongelaciones de la Línea Celular RK-13 en cada lote de células fue la siguiente:

- ❖ Apariencia microscópica: Epitelial.
- ❖ Velocidad de crecimiento: 24-48 horas.
- ❖ Producción ácida: pH 7
- ❖ Eficiencia de planteo: Aproximadamente el 39 %.

El modelo que se refleja a continuación registra el control de la línea celular RK-13 durante la descongelación del pase 198. (PNO. Código: 7-08-019/00).

Los datos coinciden con el protocolo de Flow Laboratorios de EU. que refiere la metodología para la producción y manejo de cultivos de células.

Los resultados experimentales mostrados en el modelo permiten verificar que la línea celular RK-13 mantiene las especificaciones de calidad referida en su certificado de concordancia emitido por la ATCC.

No. De Orden: 0.01		Fecha: 30/07/04
Nombre de la Línea celular: RK-13		No de subcultivos: 198
Origen de las células: ATCC		No de células iniciales: 10 x 10 ⁶ cel/mL
Composición del medio: MEM-A 90%, SFB 10% (Hy Clone), Triptosa fosfato 10%		Lote de suero: Lote 81
Sistema de cultivo Empleado: Estacionario		Tiempo de células en cultivo: 72 horas
Total de ámpulas congeladas: 35 criotubos/mL	Concentración de células por ámpula: 2 x 10 ⁶ células/mL	Viabilidad: 100 %
Ubicación de las ampulas: Nitrógeno Líquido: Termo No. 2		
Ensayo de esterilidad: Satisfactorio. No presencia de bacterias, hongos, agentes extraños y agentes hemoadsorbentes.		
Ensayo de estabilidad: Estable, mantiene sus características y parámetros específicos.		
Observaciones: Las línea celular puede ser utilizada como sustrato para la replicación del virus.		

3.1.2.1 BCM y BCT de la línea celular RK-13.

Al respecto, Joner (1988) y Stever (1996), plantearon que la caracterización del Banco de Células es un elemento fundamental para la elaboración del VSM y vacunas, así como la documentación correspondiente, la cual debe estar redactada de manera tal que elimine cualquier tipo de ambigüedad, con una presentación clara y ordenada, facilitando su funcionalidad.

En nuestro trabajo, se estableció el BCM y BCT a un nivel de pase determinado, manteniendo las células congeladas en Nitrógeno Líquido. (PNO. Confección de BCM y BCT. Código: 07-08-064/00).

El BCM se conformó con 40 criotubos envasados a razón de 1 mL/criotubo y el BCT se conformó con 20 criotubos envasados a razón de 1mL/ criotubo. Se conservaron en tanques diferentes de nitrógeno líquido, para asegurar sus condiciones de mantenimiento, esterilidad, morfología, velocidad de crecimiento, pH y eficiencia de planteo.

Bussard et al (1985), definen los bancos celulares como los lugares donde se encuentran almacenados, protegidos, congelados, identificados, organizados y controlados los sustrato celulares a los cuales se les ha comprobado su utilidad. Estos son mantenidos bajo condiciones que garanticen su calidad por tiempo indefinido.

Según la OMS (2000), el BCM se construye a partir de células que se obtienen de una suspensión celular homogénea, derivada de la línea celular original, producida o adquirida por el fabricante. Las células que se conservan en este banco, constituyen la reserva principal de la línea celular y nunca deben emplearse con fines de producción. Por su parte, el BCT se construye a partir de una cantidad de células obtenidas de una o más alícuotas de células maestras y es aconsejable su preparación para un año de trabajo con un número de viales que garanticen realizar descongelaciones periódicas, evitando la permanencia de las células en cultivos por períodos prolongados.

En nuestro trabajo, el BCM y BCT cumplen con lo establecido por la OMS, ya que se utilizó la línea celular (Pasaje 198), procedente de la ATCC como partida para la construcción del BCM y de un ampulla de éste se elaboro el BCT.

Stever y Ostrove (1996), plantearon que el establecimiento de BCM y BCT, bien caracterizados, ha sido considerado por las Agencias Regulatorias como el primer paso para garantizar la calidad de un producto biofarmacéutico obtenido a partir de un sustrato celular.

Por otra parte, Lubinlecki (1985) comento acerca de la necesidad de mantener una correcta atención a estos Bancos de Células, que garanticen la obtención de resultados óptimos y reproducibles en el trabajo, resultando un elemento importante de valor estratégico y económico.

3.2 Determinación de la presencia del antígeno vacunal por IFD.

Uno de los requerimientos establecidos por la OIE para la identificación del agente biológico, es el método inmunológico usado para detectar el antígeno de la PPC, a través de la prueba de anticuerpos fluorescentes, ya sea en órganos o en las líneas celulares.

La determinación de la presencia del antígeno vacunal en la línea celular RK-13 se realizó por el método de IFD, teniendo en cuenta la observación microscópica (fig.4). Se apreció una coloración verde manzana en el citoplasma de las células, que caracteriza la formación del inmunocomplejo. (Margni, 1982)

Los resultados de la tabla #1 muestran que en las diluciones -1, -2 y -3 se observaron células fluorescentes que demuestran la replicación del virus en el interior de ellas. En la dilución -4, las placas fluorescentes no son abundantes y en la dilución -5 no se apreció su aparición.

Mediante los cálculos estadísticos de Reed- Muench se obtuvo un título de $10^{2.6}$ u/mL. Para concentrar la masa viral y obtener títulos más altos, se decidió utilizar la técnica de ultrafiltración.

Al concentrar la masa viral, se comprobó la presencia del virus en las células utilizando el mismo método de IFD, observándose en este caso, placas fluorescentes en las diluciones -1, -2, -3, -4, representativo de títulos de $10^{4.5}$ u/mL. (Tabla #2). Ambos resultados fueron corroborados en el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA).

Medina et al., (1989) utilizaron la cepa China Lapinizada adaptada a la línea celular RK-13 y clonada en el 5^{to} pasaje para obtener un antígeno vacunal y demostraron la presencia del mismo con el método de IFD. Los resultados expresados en la observación fueron muy similares a los nuestros ya que obtuvieron títulos variables entre 10^3 a 10^4 u/mL.

Por otra parte Terpstra et al., (1990) determinaron el título por IFD del VSM utilizado en la elaboración de una vacuna desarrollada en cultivo celular contra la PPC, utilizando la cepa china y como sustrato la Línea celular de riñón de cerdos (SK-6). El resultado osciló entre $10^{4.5}$ a $10^{5.65}$ u/mL y dicho VSM fue capaz de proteger a los cerdos del virus salvaje.

Según la ficha de armonización editada en Pestearmo en el año 2003, la dosis del virus Lapinizado adaptado a cultivo celular recomendada para las vacunas de PPC, debe ser de 10^4 DP₅₀ en cerdos,

Después de conocer los resultados de la prueba de IFD y comprobar que la concentración del antígeno vacunal correspondía con los niveles establecidos por la OIE (2000), que plantea que el título viral del VSM de una vacuna contra la PPC debe ser mayor o igual que $10^{3,5}$ u/mL, se decidió utilizar el antígeno vacunal, como VSM para elaborar la nueva vacuna.

Para observar el comportamiento de los estabilizadores se llevó a cabo la liofilización del antígeno vacunal en un liofilizador de ampula. La liofilización se realizó según lo establecido en el PNO correspondiente y al final del proceso se obtuvo en el fondo del ampula una película en forma de cáscara y color blanquecino, la que fue enviada al Laboratorio de Control Estatal, para realizar el control de calidad en cuanto a inocuidad y potencia.

3.3 Evaluación de la pureza del VSM.

En nuestro país y en una gran parte del mundo, la incidencia de infección por VDVB es alta en los cerdos, por lo que es necesario realizar un ensayo para la discriminación de este pestivirus (Sánchez, 1998).

Los resultados de la técnica de inmunofluorescencia para la detección del VDVB, fueron negativos, evidenciando así la no presencia de este virus en el VSM. (Tabla # 3).

Para distinguir en el campo el VPPC del VDVB, Terpstra et al. (1990) realizaron un ensayo *in vivo* en cerdos, para determinar la pureza de la cepa china adaptada a la línea celular SK6. Sus resultados mostraron con claridad de que los sueros de los animales examinados estaban libres de anticuerpos específicos contra VDVB, lo que evidenció que el VSM utilizado estaba libre de VDVB. Nuestros ensayos se realizaron *in vitro*, no obstante, obtuvimos resultados semejantes en cuanto al criterio de pureza del VSM.

3.3.1 Inocuidad.

La prueba de inocuidad del antígeno vacunal liofilizado se realizó en el Laboratorio de Control Estatal (LCE), del Instituto de Medicina Veterinaria (IMV).

Las referencias para el intercambio internacional del Manual de la OIE del 2000 plantean que las vacunas no deben ocasionar reacciones adversas en los cerdos, determinadas bien por cambios en la temperatura, peso o talla de los animales vacunados en comparación con el grupo control.

La Farmacopea Europea del 2000 establece que se deben utilizar animales con un peso corporal entre 15 y 35 kg. Se debe valorar la ganancia diaria de peso, la cual debe ser igual a 0,5 lb. en un régimen de tenencia y manejo zootécnico óptimo y la misma no debe ser alterada.

Además, debe registrarse la temperatura diaria de los animales utilizados en este ensayo por vía rectal para comprobar posibles reacciones generales.

Durante el experimento, los cerdos inoculados con el VSM no presentaron signos, ni síntomas atribuibles a la enfermedad, ni se produjeron muertes. La temperatura corporal no alcanzó los 40,5^oC. Los animales mantuvieron el apetito, y la conversión fue adecuada (0,5 lb/día), para la edad y régimen de alimentación. El resultado emitido por este laboratorio fue de satisfactorio. (Anexos # 1).

En este sentido Teillagorry (1987) planteó que para considera satisfactorio el VSM a través de la prueba de inocuidad, ningún cerdo vacunado debe presentar reacciones desfavorables atribuibles al producto y el aumento diario de temperatura durante el periodo de observación no debe ser superior a 0,5 ^oC (Villamil, 1997)

Terpstra et al, (1990) realizaron pruebas de inocuidad en cerdos inoculando 10^{5,8} Dosis Medias Infeccivas en Cultivos de Tejidos (TCID₅₀) de virus de la cepa China adaptada a la línea celular SK-6. Sus resultados mostraron que las temperaturas no excedieron el valor normal.

Medina et al. (1989) en su estudio de la cepa Portoalegre (virus de la cepa China adaptada a cultivo celular), demostraron al vacunar cuatro cerdos con 10 dosis de la vacuna experimental que no se presentaban reacciones atribuibles a la misma y la temperatura corporal se mantuvo dentro de los límites normales, no excediendo de 40 ^oC, durante los 21 días que duró el estudio.

Por otra parte, Bekkum (1997), planteó que cerdas vacunadas con la Cepa China desarrollan viremia, entre los 3-11 días post-vacunación período en el cuál se puede registrar aumento en la temperatura corporal.

3.4 Evaluación de las DP₅₀ del VSM.

En el mismo LCE del IMV se realizó la determinación de la DP₅₀ del VSM liofilizado. El resultado emitido mostró que el título en cerdos era de 10^{2,75} DP₅₀, lo que significa que el antígeno vacunal tiene más de 100 Dosis Protectivas media, (Anexo # 1) y ante el reto, los animales mostraron un 100% de protección.

En 1997 el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) y la Asociación Colombiana de Porcinocultura, con el apoyo del Fondo Nacional Porcino desarrollaron experimentos mediante la prueba de potencia en cerdos que permitieron evaluar la calidad de las antígenos vacunales elaborados a partir de la cepa China tipo virus modificado cosechadas en diferentes líneas celulares y comercializadas en Colombia. No fueron observadas reacciones desfavorables locales ni signos clínicos de PPC durante el periodo de observación post-reto, por lo tanto el porcentaje de protección fue del 100%. Sin embargo, plantearon que durante el experimento algunos animales presentaron signos respiratorios, depresión y fiebre ligera (Villamil, 1997), no ocurriendo así en nuestro ensayo.

Wensvoort (1989), Terpstra (1990) y Moormann (1993) al evaluar lotes de vacunas con esta cepa China Lapinizada adaptada a la línea SK-6, y enfrentarlos a 100 DI₅₀ de la cepa virulenta Brescia de PPC, encontraron que el 96.7% de los animales respondieron con títulos mayores de 1:25 de anticuerpos neutralizantes, los cuales fueron protectores al desafío.

Bass (1987), del Departamento de Laboratorios de Chile, realizaron un análisis de los criterios utilizados en las pruebas de Potencia de las vacunas de PPC, y expresaron que para que una vacuna contra esta enfermedad fuera efectiva, al ser retados los cerdos con 100 000 DI₅₀ de virus salvaje de PPC, en las diluciones 1/10, 1/40 y 1/160, estos no debían presentar signos clínicos ni virológicos (sin aislamiento de virus en órganos, después del desafío), lo que finalmente determinaba que esa vacuna tenía mas de 100 DP₅₀.

El VSM obtenido en nuestra Empresa cumple con los requerimientos expresados por dichos investigadores, ya que posee mas de 100 DP₅₀, al igual que el antígeno utilizado para la vacunación controlada, llevada a cabo por la Unión Europea (UE) en la década del 80, con el objetivo de erradicar posteriormente la enfermedad. Según plantearon Vandeputte y Chappuis (1999), una vacuna con 100 DP₅₀ es un instrumento interesante para controlar la circulación de un virus virulento. (CFR-9, 2000)

Por otra parte, con relación a la prueba de potencia las vacunas deben ofrecer más de un 80% de protección para ser consideradas aptas (OIE, 2000).

Schultz y Leunen (1987) plantearon que cuando se han utilizado vacunas para proteger al 80% de los porcinos o menos, se ha observado la presentación clínica de la enfermedad frente a una exposición con virus de campo y en el caso de las crías de cerdas parcialmente inmunizadas pueden nacer infectados.

Teniendo en cuenta que los resultados de pureza, inocuidad y potencia fueron los esperados y coincidían con otras investigaciones realizadas, se decidió liofilizar el resto de la masa viral elaborada como VSM en el liofilizador de bulbos a razón de 3 ml por bulbo, para mayor estabilidad y posteriores estudios, conservándose a -20°C hasta su utilización.

3.5 Evaluación de la replicación y cálculo del título viral del VSM en conejos.

En nuestra investigación a los conejos se le determino por vía rectal la temperatura una vez antes de la inoculación y tres veces diariamente después de inoculados, para realizar el estudio de la curva térmica.

El aumento de temperatura comenzó a partir del 2do día post-inoculación, hasta el 4to día, obteniéndose valores de temperatura de 41,0 °C – 41.2 °C durante la prueba, indicativo de la replicación del virus en los animales.

Aparte de la apatía y rehúse del alimento durante el período febril, los animales que presentaron otras manifestaciones fueron eliminados. La figura # 5 muestra el comportamiento de los picos febriles en la dilución -5 que fue la más alta dilución donde se presentaron animales positivos. Tres días post-inoculación recuperaron la temperatura normal, menor o igual a $39,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Todos los conejos que reaccionaron de esta manera típica se sacrificaron y en la necropsia se encontraron bazo inflamados de color rojo oscuro brillante en el 85 % de los animales inoculados los ganglios inflamados y hemorrágicos en el 68% y en el 57 % los hígados estaban inflamados y friables lo que reafirmaba la presencia del virus en estos órganos.

Nuestros resultados coinciden con lo expresado por Terpstra (1978), quien refiere que los conejos pueden ser usados como método alternativo, para la inoculación de la cepa China en este hospedero, pues a través de pasajes seriados este investigador adaptó la cepa China de la PPC en estos animales con el fin de que fuera elaborada una vacuna contra la enfermedad. El signo principal indicativo de una buena replicación fue el aumento de la temperatura corporal.

Ferrari (1992) adaptó la cepa China a una línea celular de riñón de minicerdo (MPK) y elaboró una vacuna contra la PPC. Este investigador en su estudio realizó inoculaciones intravenosas en conejos con esta cepa adaptada y observó la respuesta clínica y virológica, apreciando que los conejos inoculados con el antígeno vacunal presentaron inflamación en algunos órganos dianas, como el bazo y comprobó por IF que había presencia del antígeno en ese órgano. (OIE, 1996).

Por otra parte, utilizando los gráficos que expresan el comportamiento febril de los animales en las diferentes diluciones, se calculó el título del VSM replicado en estos animales. Los resultados fueron interpretados utilizando los cálculos estadísticos de Reed-Muench y se obtuvo que el VSM presentaba título de 10^5 $\text{DI}_{50}/0,2\text{mL}$ en conejos.

Cuando las cepas adaptadas al cultivo celular, son procedentes de la cepa China Lapinizada, muchos investigadores consideran conveniente establecer una correlación entre las DI_{50} en conejos y las DP_{50} en cerdos, para con ello calcular el título de la potencia de la vacuna sin necesidad de tener que utilizar cerdos ni virus de confrontación, y de esta forma, sustituir las pruebas de potencia en cerdos que demoran 28 días (método clásico), y acelerar las pruebas a 7 días (método de titulación en conejos).

Tellagorry y Polanco (1975) determinaron la relación entre la DI_{50} en conejos y la DP_{50} en cerdos de la vacuna elaborada en LABIOFAM con la cepa China y concluyeron que un lote de producción con esta cepa es satisfactorio cuando los títulos están entre 10^3 - 10^5 $\text{DI}_{50}/0,2\text{ mL}$, lo que equivale a 80- 640 DP_{50} en cerdos.

3.6 Elaboración de un lote piloto a escala de laboratorio.

Se elaboró un lote piloto a escala de laboratorio, teniendo en cuenta los procedimientos descritos en el Departamento de Elaboración de vacunas en cultivo celular de la Empresa LAPROVIR # 7, en cuanto condiciones de trabajo.

La mezcla obtenida se envasó en bulbos de 10 mL y se envió al departamento de liofilización para su mejor conservación, proceso que duró de 17 a 20 horas.

Culminado este proceso, se procedió a observar las características organolépticas del liofilizado, obteniéndose una pastilla de color blanquecino. El título viral por IFD en el liofilizado mostró un valor de 10^5 u/mL.

Nuestros resultados coinciden con Polanco y Tellagorry al plantear que un lote de vacuna se consideraba satisfactorio cuando los títulos expresaban valores entre 10^3 - 10^5 cf/mL y además, con lo establecido por la OIE y el CFR-9 (2004) cuando plantean que una vacuna elaborada con esta Cepa China protege a los cerdos susceptibles cuando las DP_{50} en cerdos son iguales o mayores a 100 DP_{50} .

La vacuna liofilizada se envió al LCE del IMV para la realización de las pruebas descritas en Materiales y Métodos (acápites 2.4.5). La humedad residual, permitirá evaluar la calidad del liofilizado así como la estabilidad de la pastilla formada. Estos ensayos se encuentran aun en ejecución, por lo que no se presentan los resultados. Sin embargo los resultados emitidos por el Laboratorio en cuanto a potencia, inocuidad y esterilidad son satisfactorios al presentar este lote a escala de laboratorio 10^3 DP_{50} , además resulto ser estéril e inocuo.

En nuestro país se inmuniza actualmente la masa porcina con la vacuna Lapinizada, la cual es elaborada utilizando al conejo como biomodelo para la replicación del antígeno vacunal.

Para la elaboración de un lote del VSM de la vacuna Lapinizada se incurre en un gasto de 4880.24 MN pudiéndose elaborar 4 lotes de vacuna nada mas. Sin embargo, el gasto incurrido en la elaboración de un lote de VSM en cultivo celular, es de 1039.50 MN, el cual permite elaborar 60 lotes de la vacuna contra la PPC, lo que representa un ahorro de 3840.74 MN.

Esta nueva tecnología en comparación con la convencional es mas limpia, de mayor calidad y los niveles productivos superiores permitirán satisfacer las demandas de los clientes de la empresa.

Conclusiones

- ❖ Se obtuvo un Virus Semilla Maestro a partir de la cepa China Lapinizada, adaptada en la línea celular RK-13, para la elaboración de un lote piloto de una vacuna contra la Peste Porcina Clásica a escala de laboratorio.
- ❖ La línea celular RK-13, utilizada como sustrato celular, para la multiplicación del virus de la PPC, evidencio una calidad óptima en términos de pureza, lo que permitió el establecimiento de los BCM y BCT con un registro completo y documentado.
- ❖ Se comprobó por Inmunofluorescencia directa (IFD) la capacidad de replicación del antígeno vacunal en el cultivo celular RK-13, con un título viral de $10^{4.5}$ u/mL en el preparado concentrado por Ultrafiltración, en correspondencia con lo establecido por la OIE.
- ❖ Se demostró la pureza del VSM liofilizado, que resulto libre de Pestivirus relacionados, así como su inocuidad en los cerdos inoculados, los que no presentaron reacciones desfavorables atribuibles al producto.
- ❖ VSM elaborado en LAPROVIR # 7 (LABIOFAM) posee una potencia satisfactoria al presentar 10 2,75 DP50 en cerdos susceptibles, confiriendo a estos un 100% de protección y un título de 10 5 DI50 en conejos.

Recomendaciones

1. Culminar la caracterización del lote piloto obtenido a escala de Laboratorio de la vacuna en cultivo celular.
2. Realizar un estudio dosis-respuesta, para determinar la dosis a aplicar en los animales susceptibles, que sea capaz de proteger contra la infección del virus salvaje.
3. Elaborar lotes a escala industrial y estandarizar la producción.

Bibliografías:

1. Adamus G, Suzanne Z, Emerson S, Hargrave P. A practical Method for Rescuing Desired Hybridomas during Monoclonal Antibody production. *In vitro cell Dev. Biol.* 1989, 25: 1141-46.
2. Aynaud JM. Principles of vaccination. In *Classical Swine Fever and Related Viral Infections*. Ed. B. Liess. Boston: Martinus Nijhoff. 1988:165–180.
3. Baron P, Leunen JI, and Vandeputte J. Inhibition of virus replication in the tonsils of pigs previously vaccinated with a Chinese strain vaccine and challenged oronasally with a virulent strain of classical swine fever virus. *Vet Microbiol.* 1995; 14: 105–113.
4. Bass SM. Control Biológico de Vacunas. *Rev. Vet. Chile.* 1987;19:11-14
5. Bouma A, de Smit AJ, De Kluijver EP, Terpstra C, Moormann RJM. Efficacy and Stability of a subunit vaccine base don glycoprotein E2 of Classical Swine Fever Vírus. *Vet. Microbiol.* 1999; 66:101-1.
6. Bussard A, Krichevsky MI, Blaine LD, Macario AI and Macario C. Hybridoma Data Bank structure and function. *Monoclonal Antibodies against bacteria.* Academic Press.1985, 1: 287-311.
7. Código Federal de Regulaciones. Título 9 (CFR. 9). Enfermedad de PPC. 2000.
8. Código Federal de Regulaciones. Título 9 (CFR. 9). Evaluación de la vacuna de la PPC en cultivos celulares. 2004.
9. Código Federal de Regulaciones. Título 9 (CFR. 9). Vacunas vivas virales. 2000; 27:113.
10. Depner K, Bauer T, and Liess B. Thermal and pH stability of pestiviruses. *Rev Sci Tech OIE (Office International des Epizooties).* 1992: 566-98.
11. Depner K, Paton DJ, Cruciere C, De Mia GM, Müller A, Koenen F, Stark R, and Liess B. Evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay for the rapid screening and detection of classical swine fever virus antigens in the blood of pigs. *Rev Sci Tech OIE (Office International des Epizooties).* 1995; 14:677–89.
12. Dunne HW. Hog cholera. In *Diseases of Swine*, 4th ed. Ed. H. W. Diagnosis. *Vet Microbiol.* 1975; 12:101–108.
13. Edwards S, Moennig V, and Wensvoort G. The development of an international reference panel of monoclonal antibodies for the differentiation of hog cholera virus from other pestiviruses. *Vet Microbiol.* 1991; 29: 101–108.
14. European Pharmacopoeia for Hog cholera Classical Swine Fever Disease Vaccine (Inactivated) for pigs. 2000.
15. FAO. Plan Continental para la erradicación de la Peste Porcina Clásica de las Ameritas. Chile. 2000.
16. <file:///A:/pestarmino.htm>. (consultada 8-07-03).
17. Franci RJB, Fauquet CM, Knudson DL and Brown F. Classification and nomenclature of viruses. Fifth Report of the international committee on the taxonomy of viruses. *Aich. Virol. Suppl.*1991, 2:223-33.

18. Frías LTM, Percedo AM y col. Manual Ilustrado: Reconocimiento a la Peste Porcina Clásica. 2003.
19. Haas R, Ahl R, Böhm R, and Strauch D. Inactivation of viruses in liquid manure. Rev Sci Tech OIE (Office International des Epizooties). 1995; 14: 435–445.
20. Hernandez PVM. Manual teórico de Virología. ISCAH. ENPES. 1987:1-358.
21. Hofmann MA, Brechtbühl K, and Stäuber N. Rapid characterization of new pestivirus strains by direct sequencing of PCR-amplified cDNA from the 5' noncoding region. Arch Virol. 1994; 139:217–229.
22. Horsch F, Buchwalder R, Hoffman F, Horsch BK, Funchs W, Heider G, Hieper TH and Meinsinger H. Inmunoprofilaxis de los animals domesticos. Editorial Acribia S.A. Espana.1995: 30-293.
23. Horzinek M.C. Some factors that may influence hog cholera transmission. Am J Vet Res. 1981, 21:464–471.
24. Hulst MM, Himes G, Newbigin E, and Moormann RJM. 1994. Glycoprotein E2 of classical swine fever virus: Expression in insect cells and identification as a ribonuclease. Virology. 1994; 200: 558–565.
25. Hulst MM, Westra DE, Wensvoort G and Moormann RJM. Glycoprotein E1 of Hog Cholera Virus expressed in insect cells protects swine from Hog Cholera. J. Virol. 1993, 67:5435-442.
26. Joner E, and Gary DC. Hybridoma Technology Products: Required Virus Testing. Biopharm.1988, 15(10):50-5.
27. Knoetig SM, Summerfield A, Spagnuol WM and Cullough. Immunopathogenesis of Classical Swine Fever. Role of monocytic cells Immunology. 1999, 95: 359-66.
28. König M, Lengsfeld T, Elbers K, Saalmüller A, and Thiel HJ.. Classical swine fever virus: Specific cytotoxic T lymphocytes and identification of a T cell epitope. J Gen Virol. 1995, 76:3039–3049.
29. Larski Z. Virología para veterinarios. 2da Edición. Prensa Médica Mexicana 1989: 278.
30. Leunen JI, Biront, P, and Vandeputte J. Inhibition of virus replication in the tonsils of pigs previously vaccinated with a Chinese strain vaccine and challenged oronasally with a virulent strain of classical swine fever virus. Vet Microbiol. 1987, 14:105–113.
31. Liess B, Frey HR and Prager D. Antibody response of pigs following experimental infections with strains of hog cholera and bovine viral diarrhea virus. In CEC Seminar on Hog Cholera/Classical Swine Fever and African Swine Fever, Hannover, EUR 5904.1992: 200–213.
32. Lowings P, Ibata G, Needham J, and Paton D. Classical swine fever virus diversity and evolution. J Gen Virol.1996; 77:1311–1321.
33. Lubinlecki AS and May LH. Considerations in regard to make cellular Banks for the production of Monoclonal Antibodies. 1985, 60:141-46.
34. Margni RA. Inmunología e Inmunohistoquímica. 3ra Ed. Edit. Científico Técnico. 1982: 45-397.
35. Medina MR. Estudo sobre un virus amostra chinesa adaptado ao cultivo celular. Porto Alegre.1989.

36. Merck. Manual Técnico de Crianza Porcina. Instituto de Medicina Veterinaria (IMV). 5ta Edición. Océano Grupo Editorial S.A. Barcelona España. 2000: 1071-2100.
37. Meyers G, Rumenapf T, and Thiel HJ. 1989. Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus. *Virology*.1989;171: 555–567.
38. Moormann RJM, Van Gennip HGP, Miedema GW, Hulst MJ and Van Rijn PA. Infectious RNA transcribed from an engineered full-length cDNA template of the genome of a pestivirus. *J Virol*.1996; 70:763–770.
39. Moormann RJM, Warmerdam PAM, Van der Meer B, Schaaper WW M. Wensvoort G, and Hulst MM. Molecular cloning and nucleotide sequence of hog cholera virus strain Brescia and mapping of the genomic region encoding envelope protein E1. *Virology*.1993 177:184–198.
40. Moran LE, Martínez MC. Metodología para la investigación del Anteproyecto de Tesis de Maestría. Dpto. de Biología. CEBl. UO.2000
41. Office International Epizooties (OIE). Normas Internacionales. Classical Swine Fever (Hog Cholera).Requirements for vaccines and Diagnostic. 1996. Chapter 2.1.13.
42. OIE. Classical Swine Fever Virus. Manual of Standards for diagnostic test an vaccines.2000:151-3.
43. OMS. Plantas para asegurar la calidad de los anticuerpos monoclonales. 42º Informe del Comité de expertos de la OMS 2000:822.
44. Paton DJ. Pestivirus diversity. *J Comp Pathol*.1995; 112:215–236.
45. Pauly T, Elbers K, König M, Lengsfeld T, Saalmüller A, and Thiel HJ. Classical swine fever virus: Specific cytotoxic T lymphocytes and identification of a T cell epitope. *J Gen Virol*.1995 76:3039–3049.
46. PNO. Confección de BCM y BCT. Código: 07-08-064/2000.
47. PNO. Conteo Celular con Cámara Contadora NEUBAUER. Código: 7-08-036/2000.
48. PNO. Descongelación Celular. Código: 7-08-019/2000.
49. PNO. Método de Congelación celular en Nitrógeno Líquido. Código: 7-08-001/2000.
50. PNO. Operación del equipo de Liofilización en ampulas. Código: 7-02-075/2000
51. PNO. Preparación del Cuarto para la elaboración. Código:7-02-054/2000
52. PNO. Puesta en marcha de los equipos de Liofilización en bulbos, Código 7-06-074/2000.
53. PNO. Subcultivos de Células de Líneas y Células de Líneas Establecidas. Código: 7-08-020/2000.
54. PNO. Ultrafiltración en equipo AMICON. Código 7-08-060/2000.
55. PNO: Ensayo de esterilidad por el Método de Ensayo. Siembra Directa. Código 8-03-003/20000.
56. PNO: Ensayo de esterilidad por el Método Directo, código: 8-03-003/2000.
57. PNO: Titulación de suspensiones biológicas por los métodos estadísticos de Reed-Muench y Spearman Kurber, código: 8-02-050.
58. Reed LI and Muench H. A simple methodo of estimatig fifty parcent end points. *Am, I. Hyg.* 1938,27:493-7.

59. Reina M. Material Docente sobre cultivo celular. 2002. mreina@bio.uop.es. (consultada Junio-2003).
60. Ressang AA. Studies on the patogénesis of Hog Cholera. Zb Vet. Med.B.1973; 20:256-71.
61. Rumenapf T, Weiland E, Stark B, Haas B, and Thiel HJ. Pestivirus glycoprotein wich induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer. J. Virol. 1991, 66:3561-69.
62. Sánchez VJM. Curso de Inmunología Porcina. Fichero Porci. 2003.
63. Sánchez VJM. PPC. Prevencion, Profilaxis, Control y Erradicación de enfermedades infecciosas porcinas.1998 .Fichero Porci.
64. Schneider R, Unger G, Stark R, Schneider-Scherzer E and Thiel HJ. Identification of a structural glycoprotein of an RNA virus as a ribonuclease. Science. 1993; 261:1169–1171.
65. Schultz RD. The immune system and vaccines: Challenges for the 21st Century. Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian, 1988; 20 (8): 25-30.
66. Skalka B .Virología Veterinaria. UH. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Instituto Cubano del Libro. 1971.
67. Stark R, Rumenapf T, Meyer G and Thiel HJ. Genomic localization of Hog Cholera Virus Glicoprotein. Virology. 1990,174:286-89.
68. Stever A and Ostrove JM. Establiching Cell Banks under Current Good Manufacturing Practices. Biopharm.1996:40-44.
69. Stewart WC, Leman RD, Glock WL, Mengeling RHC, Penny E and Straw BA. Hog cholera. In Diseases of Swine, 5th ed. Ed. Iowa State Univ Press.1981.
70. Susa M, König M, Saalmüller A, Reddehase MJ, and Thiel HJ. Pathogenesis of classical swine fever; B-lymphocyte deficiency caused by hog cholera virus. J Virol .1992, 66:1171–1175.
71. Tabloide Universidad para Todos. Biotecnología. Editorial Juventud Rebelde. 2002.
72. Teillagorry L, Polanco R y Redondo A. Relación entre las DI50 en conejos y las DP50 en cerdos de la vacuna contra el Cólera Porcino Clásico elaboradas con la cepa China. Jornada Científica de Cubavet.1975.
73. Terpstra C, Woortmeyer R and Barteling SJ. Development and properties of a cell culture produced vaccine for Hog Cholera based on the Chinese strain. Res. Dtsch. Tierarztl. Wschr. 1990; 97: 77-79.
74. Terpstra, C. Detection of C-strain virus in pigs following vaccination against swine fever. Tijdschr voor Diergeneeskunde.1978; 103:678–683.
75. Tuero C, Díaz de Arce H, Veja A, Barrera M y Frias MT. Aislamiento e identificación del Vírus de la PPC durante un brote de la enfermedad en Cuba. Rev. Salud. Anim. 1995, 17:241-44.
76. Van Bekkum, J. G. Experience in the Netherlands with the lapinised, so-called Chinese (C) strain of vaccine. In CEC Seminar on Hog Cholera/Classical Swine Fever and African Swine Fever, Hannover, EUR 5904, 1997: 379–391.

77. Van der Molen EJ and Van Oirschot JT. Congenital persistent swine fever (hog cholera). I. Pathomorphological lesions in lymphoid tissues, kidney and adrenal. *Zentralblatt für Veterinärmed (B)*.1981; 28:89–101.
78. Van Oirschot JT. Experimental production of congenital persistent swine fever infections. II. Effect on functions of the immune system. *Vet Microbiol*. 1992; 4:133–147.
79. Van Oirschot JT. Effect of infections with swine fever virus on immune functions. II. Lymphocyte response to mitogens and enumeration of lymphocyte subpopulations. *Vet Microbiol*.1983; 8:81-95.
80. Villamil NM, Sabogal R. Evaluación de las vacunas de Peste Porcina Clásica producidas en células. *Rev. ICA*. 1997:28743.
81. Weiland E, Ahl R, Stark R, Weiland F and Thiel HJ. A second envelope glycoprotein mediates neutralization of a pestivirus, hog cholera virus. *J Virol*.1992; 66:3677–3682.
82. Wensvoort G, Bloemraad M and Terpstra C. An enzyme immunoassay employing monoclonal antibodies and detecting specifically antibodies to classical swine fever virus. *Vet Microbiol*.1987; 17:129–140.
83. Wensvoort G, Terpstra C, De Kluijver EP, Kragten C and Warnaar JC. Antigenic differentiation of pestivirus strains with monoclonal antibodies against hog cholera virus. *Vet Microbiol*.1989; 21:9–20.
84. Xue W and Minocha HC. Identification of the cell surface receptor for Bovine Viral Diarrhea Virus by using anti-ideotipie antibodies. *J. Gen. Virol*.1993:73-74.

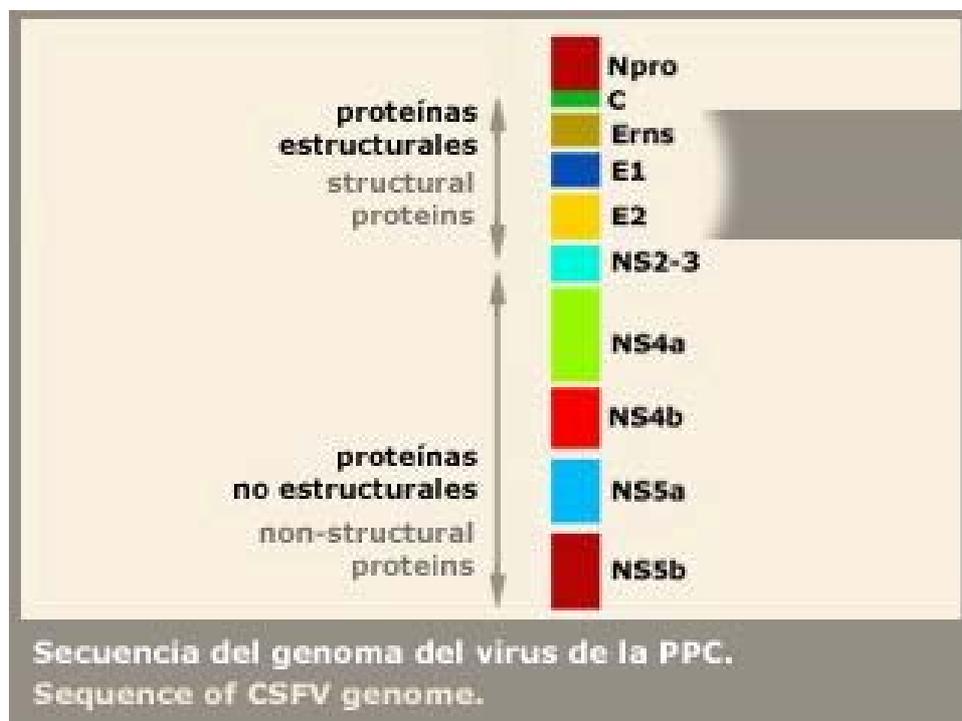


Fig. 1 Secuencia del genoma del virus de la PPC

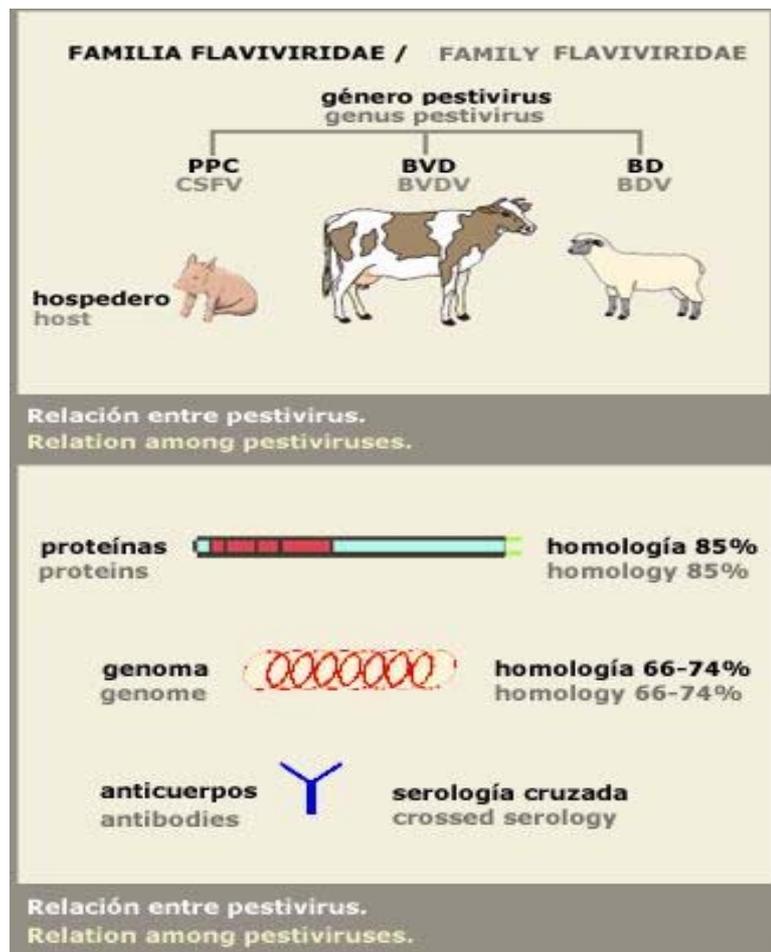


Fig . 2. Relación entre Pestivirus

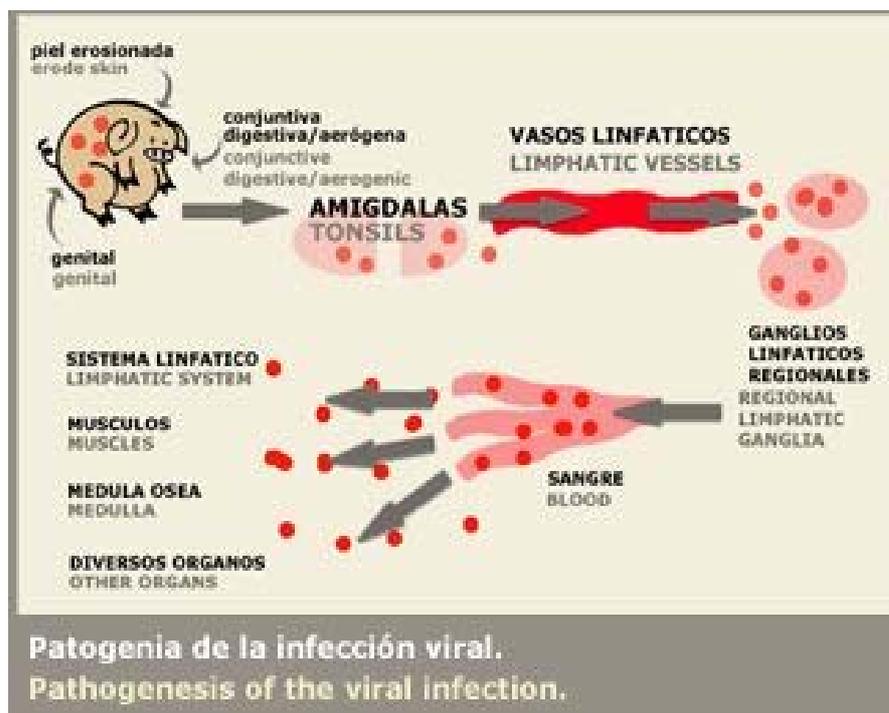


Fig. 3. Patogenia de la infección viral

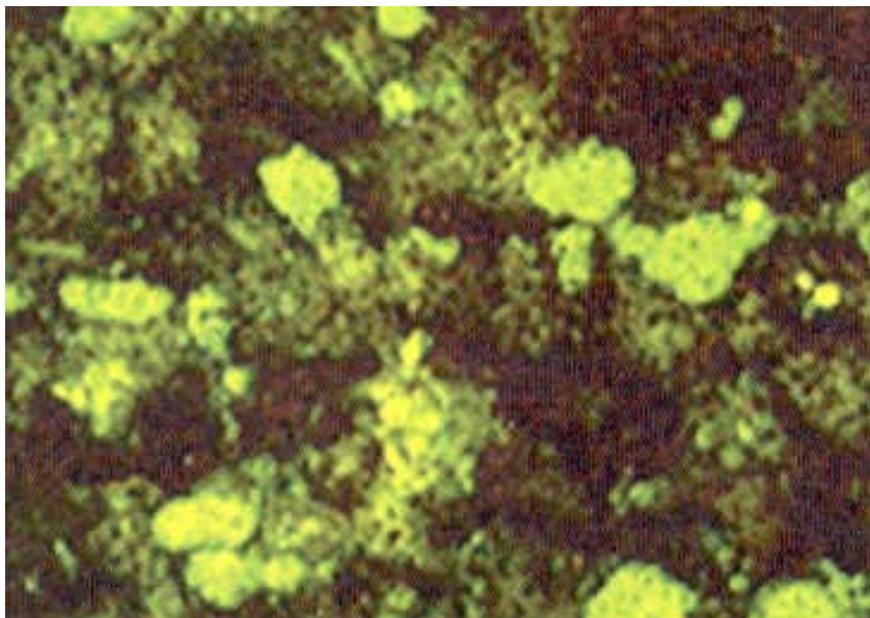


Fig. 4. Observación de las células RK-13 fluorescentes infestadas con la cepa vacunal adaptada de la PPC

Tabla # 1. Resultados de la titulación viral por IFD en células de la línea RK-13 infectadas por el VPPC.

Muestras	Diluciones para IFD					Resultados
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	
Control Negativo (Célula RK-13 virgen)	-	-	-	-	-	Negativo
Control positivo (Aislamiento de animal enfermo)	+	+	+	+	+	Positivo
Replica # 1 Pasaje 20 de la cepa adaptada	+	+	+	-	-	10^3
Replica # 2 Pasaje 20 de la cepa adaptada	+	+	±	±	-	$10^{2.6}$

Tabla # 2. Resultados de la titulación mediante IFD de la masa viral concentrada por ultrafiltración.

Muestras	Diluciones para IFD					Resultados
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	
Control Negativo (Célula RK-13 virgen)	-	-	-	-	-	Negativo
Control positivo (Aislamiento de animal enfermo)	+	+	+	+	+	Positivo
Replica # 1 Antígeno vacunal concentrado	+	+	+	+	±	10 ^{4.5}
Replica # 1 Antígeno vacunal concentrado	+	+	+	+	+	10 ⁵
Replica # 2 Antígeno vacunal concentrado	+	+	+	+	±	10 ^{4.5}

Tabla # 3. Resultados de la técnica de IFI para la detección del VDVB en el VSM.

Muestras	Diluciones para IFID					Resultados
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	
Control Negativo (Célula RK-13 virgen)	-	-	-	-	-	Negativo
Control positivo (Aislamiento de animal enfermo)	+	+	+	+	+	Positivo
Replica # 1 del VSM de PPC	-	-	-	-	-	Negativo
Replica # 2 del VSM de PPC	-	-	-	-	-	Negativo
Replica # 3 del VSM de PPC	-	-	-	-	-	Negativo

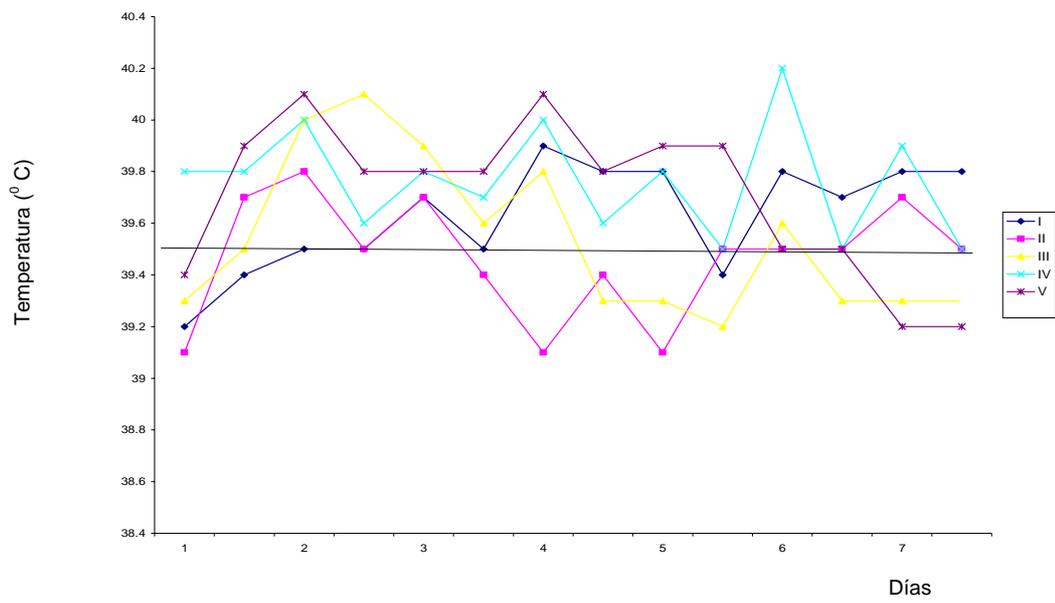


Fig. 5. Comportamiento de la curva térmica de los conejos inoculados con la dilución -5 del VSM

Anexo 1

Resultado del Laboratorio del Control Estatal (LCE), del Instituto de Medicina Veterinaria (IMV).

[Ver Documento Impreso](#)