

Título: EVALUACION DE UNA VACUNA EXPERIMENTAL PARA EL PARAMIXOVIRUS DEL SINDROME DEL OJO AZUL.

Autores: * Hernández - Jáuregui, P., Sundquist, A., Fuentes, M., Díaz Orea, A., Moreno López, J.

Institución: Hospital de Especialidades, Centro Médico Regional Puebla, IMSS.
2 Norte No. 2004 C.P. 72000.

Area: Sanidad Animal

INTRODUCCION .- El padecimiento conocido como el Síndrome del Ojo Azul fue analizado con el método científico en un brote en lechones afectados con signos neurológicos por Stephano y col en el mes de mayo de 1980 (1), en donde estudiaron un brote agudo en La Piedad Michoacán, describiendo el cuadro clínico y entre las lesiones histopatológicas encontradas; meningoencefalitis, neumonía intersticial, opacidad de la córnea, aislando de los tejidos de los cerdos clínicamente afectados, un virus hemoaglutinante y formador de sincitios en células cultivadas. El virus aislado por Stephano, reúne propiedades comunes a los Paramixovirus, por lo que desde entonces propone su identificación (Stephano 1981 (2)). En la misma reunión de 1980, Campos (3) describe; El Síndrome del Ojo Azul, aludiendo a este padecimiento, como carencial en vitaminas, y/o a la presencia de tóxicos en los alimentos balanceados. Por los estudios subsiguientes, se concluye que el padecimiento tiene un sustrato viral para su propagación en el campo, confirmado por los estudios experimentales de transmisión y reproducción del cuadro clínico (Stephano 1988 (5), Martínez 1985 (4)). El virus de la enfermedad del Newcastle de las aves, el Paramixovirus de los pavos, el Parainfluenza PI-3 de los bovinos, el virus Sendai, el Yucaipa y el de la Parotiditis humana, constituyen el género de los Paramixovirus, de la familia Paramixoviridae que agrupa otros dos géneros; los Morbillivirus y los Pneumovirus. Recientemente Sundquist y col (1990) (6) han propuesto la clasificación de un nuevo Paramixovirus, basados en la comparación de la migración de las proteínas virales del Paramixovirus LPM-V del Síndrome del Ojo Azul, previamente caracterizado por Moreno y col (1986) (7), con algunos de los Paramixovirus arriba mencionados, proponiendo la clasificación de un nuevo Paramixovirus y el primero para los cerdos. Los estudios de anticuerpos circulantes contra el Paramixovirus LPM-V a cargo del grupo del Dr. Correa Girón, revelan la presencia de anticuerpos anti-paramixovirus provenientes de un banco de sueros de cerdos, por la técnica de Inhibición de la Hemoaglutinación (Rosales 1986 (8)) y en trabajos subsiguientes; Martínez (1986) (9) informa sobre estudios de presencia de anticuerpos en la Piedad, Mich. Con la misma metodología, el grupo de Stephano, realiza un estudio epizootiológico en varios Estados de la República. El reciente desarrollo de la técnica de ELISA por el grupo de Moreno, para la detección fina de anticuerpos contra el Paramixovirus Porcino LPM-V, ha permitido el análisis epizootiológico de numerosos sueros. Contando con esta información, consideramos oportuno, realizar la comparación de títulos de anticuerpos, entre las técnicas de Inhibición de la Hemoaglutinación, ELISA y Suero Neutralización, de animales expuestos naturalmente a brote agudo y a los animales vacunados con una vacuna experimental realizada en cultivos celulares.

MATERIAL Y METODOS

Se estudiaron poblaciones de cerdos con y sin antecedentes clínicos del Síndrome del Ojo Azul. Los sueros de animales con antecedentes de brote agudo de la enfermedad, provinieron de la granja, Los Chupos, Tecamachalco, Puebla. La población de cerdos sin antecedentes clínicos del padecimiento, provino del Estado de Querétaro.

Los sueros de animales vacunados con una vacuna experimental, realizada en cultivos celulares, utilizando el virus original LPM-V como fuente de antígeno, provino de cerdos de la Piedad, Michoacán y de Degollado, Jalisco.

ELISA COMPETITIVA

Se cubrieron las tiras de poliestireno para ELISA (Lab.COSTAR) con antígeno viral, a una concentración de 0.25µg/100 ml. por pozo, incubados a 4°C por 12 horas. Las tiras se lavaron tres veces con solución de lavado. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado. En cada uno de los pozos se colocaron 25 ul. de la solución bloqueadora, 25 ul de los sueros problema, incluyendo sueros controles diluidos 1:100 y 1:1000. A todos los pozos, se agregó 50 ul. del conjugado diluido 1:100 con solución bloqueadora. Se incubaron dos horas a temperatura ambiente. Se vació la placa y se lavaron tres veces con solución bloqueadora. Se agregó 100 ul./pozo de sustrato, el cual es preparado inmediatamente antes de usarse. Se incubaron por 10 minutos, deteniendo la reacción, deteniendo la reacción, agregando 100 ul./pozo de ácido sulfúrico 1M. La lectura de la absorbancia a 450 nm fue realizada en un lector de ELISA.

INHIBICION DE LA HEMOAGLUTINACION (IH)

Los sueros problema fueron pre-tratados con Kaolín al 2% incubados 1 hora a temperatura ambiente invirtiendo cada 10 min. Se centrifugaron durante 10 min. a 1500 rpm. El sobrenadante se inactivó con glóbulos rojos de pollo al 50 %, se incubaron 12 horas a 4°C. Se centrifugaron para retirar los eritrocitos e inactivaron por calor a 56°C./30 min. En una placa de poliestireno para microtitulación se realizaron diluciones seriadas de la muestra problema y control con PBS hasta una dilución de 1:532. Recordando que el suero por la inactivación queda diluido 1:4. A todos los pozos se agregaron 50 ul. de virus LPM-V con HA 1:32 y 50 ul. de eritrocitos de pollo al 0.5%. Se incubaron a temperatura ambiente por 1 hora. La lectura se informa, con el título hasta donde se observa inhibición.

VIRUS NEUTRALIZACION (VN)

Para la microtitulación de la prueba de VN, se usaron placas de microtitulación Nunc a cuyos pozos se agregó 25 ul de medio de cultivo Eagle con excepción de la primera hilera. Una muestra de cada suero problema en volumen de 25 ul se agregó en todos los pozos de la primera y segunda hilera realizando columnas por duplicado. Se realizaron diluciones dobles seriadas. El virus LPM-V titulado previamente se diluyó a 100 TCID50 / 25 ul. Cada pozo recibió 25 ul de ese virus diluido. Las placas se movieron suavemente para permitir la mezcla del contenido en cada pozo y se incubaron a 37°C durante una hora. Pasado este tiempo de incubación, se agregaron a cada pozo 5×10^5 de una suspensión de células IBRS en medio de Eagle y se incubaron durante 48 a 72 horas. Cada columna de las series de sueros incluyó un suero testigo positivo y un testigo. Los títulos de VN se expresaron como positivos a la dilución final más alta donde el suero neutraliza el efecto citopático del virus.

ORIGEN DE LA VACUNA Y DE LOS SUEROS VACUNALES

Se utilizó el virus LPM-V originalmente caracterizado por Moreno y col como fuente de antígeno, multiplicado en células PK-15 en el pase 48 en el sistema convencional de cultivos celulares. El sobrenadante de esos cultivos celulares se concentró y tituló por la técnica de Hemoaglutinación (HA). Se agregó HI -- dróxido de Aluminio como adyuvante. Se aplicó 1 ml. por vía intramuscular a -- cerdos clínicamente sanos de las siguientes edades. Hembras al inicio de la -- gestación, lechones de 15 días de edad, cerdos de 35-40 días de edad. Se obtu-- vo una muestra de sangre antes de la vacunación y 15 días después de la inmu-- nización. Se separó el suero en condiciones de asepsia y se mantuvieron conge-- lados hasta el día de las pruebas de laboratorio.

RESULTADOS

TABLA I Correlación entre los títulos VN, IH y ELISA competitiva en Sueros de Brote agudo al Paramixovirus del SOA.

Título Virus Neutr. (VN)	Títulos Inhibición de la Hemoaglutinación		ELISA Competitivo
2 - 5	8-15	256-13	50 -41
1:8 - 10	32- 4	512- 7	
1:16 - 31	64- 8	1020- 4	50 - 5
No est. - 2	128- 6	No est.- 4	No est.- 2
Total	46	44	46
Total Muest.	48	48	48
Positivos	41 % Sensib	Posit. 29 % Sensib.	Posit. 41 % Sensib.
Negativos	5 Relat.	Neg. 15 Relat.	Neg. 5 Relat.
	89.1	65.9	89.1

TABLA II Correlación entre los títulos VN - IH - ELISA Sueros Vacunales - cerdos 30 - 45 días Zona libre de SOA. Fac. Med. Vet. U.V. Veracruz, Ver.

Título Virus Neutr. (VN)	Títulos Inhibición de la Hemoaglutinación (IH)		ELISA Competitivo
2 - 2	8 - 7		50 - 32
1 : 4 - 7	16 - 17		50 - 3
1 : 8 - 6	32 - 11		
1 : 16 - 20			
Total	35	35	35
Total Muest.	35	35	35
Positivos	33	Posit. 28	Posit. 32
% Sensib.	94.2	% Sensib. 80.0	% Sensib. 91.4

PRUEBA DE CAMPO

Se inmunizaron 3,000 animales de origen diverso al entrar a las instalaciones. Se obtuvieron sueros de 100 cerdos al azar en dos ocasiones postvacunales con intervalos de 15 y 30 días. La respuesta inmune de este grupo puede calificarse de buena tanto para técnica de HI como la de ELISA.

La aplicación de la vacuna LPM en cerdos con madurez inmunológica aporta anticuerpos circulantes a los 15 días postvacunales y se mantienen aun altos por 30 días con lo que los tiempos críticos de infección pueden controlarse. La evaluación clínica en estas granjas donde se inmunizaron 3,000 cerdos, en el pasado invierno de 1989-1990 fue altamente satisfactoria. No se presentó brote de Ojo Azul como acontecía periódicamente y particularmente en el invierno.

TABLA III Títulos de sueros vacunales cerdos 30 - 35 días

Area con brote de SOA, Degollado, Jal.			
Títulos Inhibición Hemoaglut. IH		ELISA Competitivo	
8	- 1	50	- 87
1:16	- 14 Posit. 94	50	- 8
1:32	- 48 % Sensib. 98.9	Total	95
1:64	- 22	% Sensib.	91.5
1:128	- 10		
Total	95		

DISCUSION

Indudablemente que la prueba de SN proporciona el mayor porcentaje de sensibilidad y es la prueba de elección, sin embargo el grado de dificultad y su costo son mayores que otras técnicas. Para propósitos de evaluación de grandes can de sueros, el método inmunoenzimático ELISA, proporciona amplia facilidad y un buen grado de sensibilidad. El método de IH, puede ser empleado cuando se carece de los otros métodos, habrá que considerarse que el porcentaje de sensibilidad es menor. La vacuna experimental LPM-V contra el Paramixovirus del SOA induce anticuerpos circulantes detectados por las técnicas arriba descritas y en prueba de campo, demostró controlar brotes agudos contra la enfermedad.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Stephano, H.A. y Gay, G.M.; Ramirez, T.C. y Maqueda, A.J.J. "Estudio de un Brote de Encefalitis en Lechones por un Virus Hemaglutinante" Memorias de la XVII Convención AMVEC, Ixtapa, Zih. Gro. (1981).
- 2.- Stephano A., Gay, G.M. "El Síndrome del Ojo Azul, Estudio Exp. Reunión de Invest. Pecuaria 1982. p 523 - 528.
- 3.- Cappos, M., E. Enfermedad del Ojo Azul o Cerdos Zarcos. Memorias de la XVII Convención AMVEC, Ixtapa, Zih. Gro. (1981).
- 4.- Martínez, L.A.; Correa-Girón, P.; Fajardo, M.R. y Garibay, M. Aislamiento y estudio de un virus porcino parecido a los Paramixovirus en: Avances en Enf. del cerdo (1985), Ed. A. Morilla, P. Correa y A. Stephano. Ed. AMVEC. pp. 313-319.
- 5.- Stephano, H.A. y Gay, G.M.; Ramirez, T.C. Encephalomyelitis, Reproductive Failure and Corneal Opacity (Blue Eye) in Pigs, Associated with a Paramyxovirus Inf. Veterinary Record 122. (1989) pp. 6-10
- 6.- Sundquist, A., Berg, M., Hernández-Jáuregui, P., Linne, T., Moreno López, J.: The Structural Proteins of a Porcine Paramixovirus (LPM-V) J. Gen Virol. 71:609-613, 1990.
- 7.- Moreno López, J., Correa Girón, P., Martínez, A., Eriksson, A. Characterization of a Paramixovirus isolated from the brain of a Piglet in México. Arch. of Virol. 91, 221-231, 1986.
- 8.- Rosales, E.F.; Correa, G.P.; Martínez, L.A. y Ramos, R.I. Anticuerpos Inhibidores de la Hemaglutinación (IH) contra el Paramixovirus Porcino de la Piedad Mich. (LMP) en sueros porcinos colectados en 1972. Memorias de la XXI reunión Nal. de AMVEC, Puebla-Tlaxcala (1986). pp. 98-100
- 9.- Martínez, L.A.; Correa-Girón P.; Rosales, E.F.; Vazquez, P.C. y Garibay, M. Memoria de la XXI Reunión Nal. AMVEC, Pue. Tlax. 1986 pp. 101-104