

## EXPERIENCIAS CON LA VACUNA CONTRA LA FIBRE POCINA CLASICA (FPC) PAV-250 DE VIRUS VIVO ATENUADO.

Correa G.,P., Coba A.,M.A., Anaya E.,A.M.  
CENID- MICROBIOLOGIA, INIFAP, SARH; km 15.5 Carretera  
México-Toluca, Palo Alto, Cuajimalpa, México D:F.,CP. 11001, AP.  
41-682, TELEFAX 5-70-06-82.

### Introducción.

La "Cepa PAV-1" fue obtenida inicialmente, en la Universidad de Cornell, Ithaca, Nueva York, EUA, a partir de la "Cepa A" del virus FPC (1,2). Esta "Cepa PAV-1" fue propagada por pases seriados en cultivos celulares (5,6). Inicialmente mataba a los cerdos pero posteriormente, después de ser pasada 40 veces en la línea de células PK-15, ya no fue letal para los cerdos. Después, al 70° pase ya no podía ser transmitida de los cerdos vacunados a los cerdos susceptibles puestos en contacto; siempre y cuando estos cerdos procedieran de madres inmunes. Pero en ese momento todavía se podía transmitir si se utilizaban cerdos procedentes de madres susceptibles (3,6). Al 250° pase, en pruebas preliminares, se observó que el virus no se difundía de los cerdos vacunados a los cerdos completamente susceptibles (Baker *et al*, no publicado).

Cuando ya se le habían dado los 250 pases, desafortunadamente ya había sido prohibida, en los EUA, la utilización de cualquier tipo de vacuna contra la FPC. Por esta razón la semilla de esta vacuna fue mantenida en el congelador durante 4 años; y después en refrigeración (en estado liofilizado), durante 3 años; teniendo entonces un título de  $10^{3.5}$  /ml (3). El objetivo de este trabajo fue el de estudiar la inocuidad, potencia, posibilidades de difusión, y antigenicidad, de la vacuna contra la FPC, preparada con el virus vivo atenuado "Cepa PAV-250"; así como su efecto al vacunar cerdos lactantes, y su utilización en el control de brotes activos de FPC, mediante la vacunación. Y también el desarrollar la tecnología necesaria para la producción industrial de esta vacuna.

### Materiales y Métodos.

**Prueba de Potencia.-** a) Se realizó una prueba de potencia utilizando cerdos de aproximadamente 18 kg. de peso, libres de anticuerpos contra la FPC. Se vacunaron 6 cerdos con 2 ml de vacuna, previamente diluida 1:100, y usando como controles 5 cerdos no vacunados, de la misma procedencia; esto fue realizado siguiendo los lineamientos de los requerimientos oficiales establecidos por la entonces Dirección General de Salud Animal, de la SAG, de México (4); actualmente cada lote de vacuna comercial se prueba en forma similar; b) antes de esto se realizaron varias pruebas de potencia usando 10 cerdos vacunados con 2 ml de esta vacuna, previamente diluida 1:10, y 5 cerdos controles no vacunados; esto fue hecho siguiendo los lineamientos establecidos

para las pruebas de potencia de las vacunas contra la FPC, establecidas por el Departamento de Agricultura de los EUA (7): c) en condiciones de campo, en una granja que en ese momento tenía brotes continuos de FPC se probó la eficacia de esta vacuna. Diez cerdos recién destetados (de 35 días aproximadamente) fueron vacunados con una dosis (2 ml) de vacuna; seiscientos ochenta y cinco cerdos recibieron 2 dosis (4 ml) de vacuna; y cinco cerdos sirvieron como controles no vacunados.

Todos estos cerdos fueron observados diariamente y la temperatura rectal diaria fue registrada en cinco o diez de los cerdos de cada grupo. En aquellos que mostraron signos de la enfermedad, se registraron los signos clínicos y las lesiones, y se intentó el aislamiento del virus a partir de sus tejidos (tonsilas, ganglios y bazo). Para lo cual los especímenes obtenidos fueron inoculados en células PK-15 y a los cinco días después de la inoculación, las monocapas de células PK-15 inoculadas, previamente desarrolladas sobre laminillas cubreobjetos, fueron teñidas mediante la técnica directa de anticuerpos fluorescentes (Solorzano, et al., 1966), utilizando un conjugado específico (Díaz et al., 1977).

**Pruebas de inocuidad y evaluación del efecto de la vacunación en la cuenta total de glóbulos blancos.**- a) Un grupo de diez cerdos fue vacunado con una dosis (2 ml) de vacuna; b) otro grupo de diez cerdos fue vacunado con dos dosis; c) y otro grupo de cuatro cerdos fue vacunado con cinco dosis de vacuna; cinco cerdos sirvieron como controles, en cada una de estas pruebas, las cuales fueron realizadas por separado. La última de esas pruebas fue realizada siguiendo los requerimientos oficiales para las pruebas de inocuidad (4). Todos los días se registró la temperatura rectal y se colectaron muestras sanguíneas tres veces a la semana, utilizando EDTA como anticoagulante, para realizar la cuenta total de glóbulos blancos; b) después de que la vacuna cumplió satisfactoriamente con los requerimientos oficiales, mediante las pruebas de inocuidad y potencia realizadas en condiciones controladas, se procedió a vacunar en condiciones de campo, varios cientos de cerdos, de diferentes edades, y de ambos sexos, en diferentes áreas de México; c) posteriormente esta vacuna fue autorizada por la DSA, SARH, para ser utilizada en México, para la prevención de la FPC. Y a la fecha se han vacunado varios millones de cerdos, de diferentes edades y sexos, en diferentes áreas porcícolas de México.

**Antigenicidad.**- a) En condiciones experimentales, 10 cerdos fueron vacunados, cada uno con dos dosis vacunales; se determinaron los títulos de anticuerpos séricos contra la FPC antes de la vacunación y 21 días después de la exposición, la cual fue hecha con el virus virulento Ames; b) en condiciones de campo, en una granja en la que se presentaban continuamente brotes de FPC se seleccionaron para ser sangrados, para obtención de una muestra de suero: cinco cerdos previamente vacunados con una dosis (2 ml); cinco vacunados con dos dosis (4 ml) y cinco cerdos que no habían

sido vacunados, los cuales sirvieron de controles. Se colectó suero sanguíneo a los 21 días después de la vacunación, y de nuevo a los 21 días después, considerando a esta última muestra como la última, después de que estos grupos de cerdos fueron expuestos durante el brote natural ocasionado por el virus de campo de FPC, establecido en la granja. Se observaron clínicamente, a diario, a los diferentes grupos de cerdos y se registraron los signos clínicos, lesiones a la necropsia, porcentaje de mortalidad y de sobrevivientes. Los sueros colectados fueron usados para realizar pruebas de sueroneutralización, para detectar anticuerpos contra la FPC, con base en la prueba de Reducción de Focos Fluorescentes (8); y las muestras colectadas en la necropsia (tonsilas, ganglios submaxilares, bazo y encéfalo) fueron utilizadas para realizar estudios de bacteriología general; y de virología diagnóstica, consistente en la realización de cortes de 8 micras, en un crióstato, y tinción de estos cortes con un conjugado específico (Díaz, et al., 1977) para el diagnóstico de la FPC, mediante la técnica directa de anticuerpos fluorescentes (Solorzano, et al., 1966).

**Prueba de no difusión.** - En dos experimentos separados, diez cerdos previamente vacunados con dos dosis de vacuna (4 ml cada uno) y cuatro cerdos vacunados con cinco dosis (10 ml a cada uno), fueron puestos en contacto, respectivamente, con cinco cerdos controles susceptibles, no vacunados; para estas pruebas también se utilizaron cerdos negativos a la presencia de anticuerpos contra la FPC (dilución 1:4), procedentes de una granja, en donde no se vacuna contra la FPC; permanecieron en contacto durante 20 y 14 días, respectivamente. Después de estos períodos, todos estos cerdos fueron expuestos con el virus virulento Ames ( $10^{6.7}$  / 2 ml, para cada uno), al final fueron observados por 21 días, y se registró la mortalidad. Esta última prueba, que es la oficialmente requerida en México (4), ha sido repetida varias veces por la Dirección General de Salud Animal, SARH, para fines de registro y comprobación de este producto y periódicamente por nosotros. La última vez que esto fue hecho fue en 1992.

**Producción de semilla con altos títulos y libre de contaminación por el virus de la Diarrea Viral Bovina (DVB).** - En algunos de los lotes inicialmente preparados de vacuna, se observó que el título del virus vacunal atenuado PAV-250 resultó ser muy bajo. Y entonces se encontró que las células utilizadas estaban contaminadas con el virus de DVB; esta demostración fue hecha tiñendo a las células sospechosas con un conjugado específico para el diagnóstico de la DVB\*. Y dado que las células utilizadas estaban contaminadas con DVB, se obtuvieron cultivos de células PK-15, de otra procedencia\*, libres de contaminación por el virus de DVB. Y por otra parte, el suero comercial usado para la preparación del medio de cultivo, fue irradiado con rayos Gamma, 25 mil Gray (Kgy); el suero también fue inactivado durante 30 minutos a 56°C, y prefiltrado y después filtrado a través de una membrana Millipore PSVP.

Por otra parte se usó un estabilizador hecho a base de gelatina y fosfatos.

\* Amablemente proporcionado por el National Veterinary Services Laboratory, U.S.D.A., Ames, Iowa, E.U.A.

**Estudio de la estabilidad de la semilla vacunal, al darle pases seriados en células PK-15.**— Con el objeto de tener información acerca de la estabilidad de la semilla del virus vacunal PAV-250, al ser pasado seriadamente en células PK-15, se procedió a darle cinco pases seriados a la semilla vacunal. Con las células inoculadas del quinto pase, se preparó un lote de vacuna, y con este se vacunaron cerdos, para determinar la potencia, inocuidad y características de no difusión de la vacuna. Todo esto fue realizado de acuerdo con las pruebas oficiales, anteriormente descritas (4).

**Vacunación de cerdos lactantes.**— Con el objeto de saber si los lechones lactantes podían ser vacunados, sin que se presentaran reacciones adversas, y para determinar si estos lechones lactantes quedaban protegidos al ser vacunados a diferentes edades, se procedió a seleccionar lotes de lechones de 1, 7, 14 y 21 días de edad, para ser vacunados, por vía intramuscular de la siguiente manera : 2 camadas, cada una con 7 lechones de un día de edad (Grupo 1); una camada de 7 lechones, de 7 días de edad (Grupo 2); una camada de 15 días de edad (Grupo 3); y una de 21 días de edad (Grupo 4); estos dos últimos grupos estaban integrados por 8 lechones lactantes cada uno. Los del Grupo 1 procedían de madres vacunadas un año antes contra la FPC, con la vacuna PAV-250; los lechones del Grupo 2 procedían de hembras no vacunadas contra la FPC; y los de los Grupos 3 y 4 provenían de madres que fueron vacunadas con la Cepa China, un año antes.

Del Grupo 1, 9 lechones fueron vacunados y 5 fueron dejados como controles no vacunados; del Grupo 2, 4 fueron vacunados y 3 fueron dejados como controles; de los Grupos 3 y 4, 5 lechones fueron vacunados en cada grupo dejando 3 de cada grupo como controles. Cada lechón recibió 2 ml de la vacuna PAV-250, la cual tenía un título que varió de  $10^{4.0}$  a  $10^{4.15}/2$  ml de Unidades Formadoras de Focos Fluorescentes (UFFF). La exposición fue realizada aplicando 2 ml de la Cepa virulenta Ames de FPC, la cual tenía un título de  $10^{5.0}$  UFFF/ml; ésto fue realizado después de aproximadamente 206 días (Grupo 1), 116 días (Grupo 2), y 51 días (Grupo 3 y 4), tiempo durante el cual permanecieron en contacto los controles con los vacunados; y los cerdos fueron observados durante los 21 días siguientes a la exposición.

**Control de brotes activos de FPC mediante la vacunación masiva.**—

Una vez probada la inocuidad, potencia, y la no diseminación de la vacuna PAV-250, en condiciones controladas, y ante la situación de urgencia que se presentaba en la Granja del Estado de México, en la cual ocurrían brotes constantes de FPC, que amenazaban con

llevar a la quiebra al porcicultor, se decidió vacunar y/o revacunar a todos los animales de la granja afectada, utilizando dosis doble (4 ml), de la vacuna PAV-250. Con miras a establecer una inmunidad de háto sólida, que no permitiera la difusión del virus virulento de campo, entre las diferentes secciones de la granja. De modo que se procedió a vacunar, tanto a los animales lactantes, como a los animales en crecimiento, finalización, hembras reproductoras y sementales.

Situaciones similares ocurridas en otras cuatro granjas, localizadas en los Estados de Morelos y en el Sur de Sonora (1984), propiciaron el que se vacunara a todos los animales de estas granjas, con una dosis doble de la vacuna PAV-250.

## RESULTADOS.

Inocuidad y efecto en el conteo total de glóbulos blancos.- a) los diez cerdos vacunados con una dosis permanecieron aparentemente normales y sin alteraciones en su temperatura rectal ni en el conteo total de glóbulos blancos; b) de los diez cerdos vacunados con dos dosis, solamente en uno se observó una ligera elevación en la temperatura rectal (40.5 C), y esto ocurrió durante el 14° día después de la vacunación; en dos de los cerdos vacunados con dos dosis, se observó una ligera disminución en el conteo total de glóbulos blancos (10,500 y 9,100/mm<sup>3</sup>), durante el tercer y séptimo días después de la vacunación, respectivamente; pero todos estos cerdos continuaron comiendo y no mostraron signos clínicos de ninguna enfermedad; c) con relación a los cuatro cerdos vacunados con cinco dosis, solamente en uno la temperatura rectal aumentó ligeramente hasta llegar a los 40.5 C, durante el cuarto día después de la vacunación, y después, éste cerdo permaneció normal; y solamente en uno se observó una muy ligera leucopenia (10,500/mm<sup>3</sup>), durante el quinto día después de la vacunación. Estos cerdos no mostraron tristeza ni signos clínicos, y continuaron comiendo normalmente; d) con respecto a los varios millones de cerdos vacunados en condiciones de campo, en las diferentes áreas porcícolas de México, en ningún caso se nos han comunicado reacciones adversas, ni fallas de vacunación.

Prueba de Potencia.- a) al llevar a cabo la prueba oficial establecida por la D.S.A., S.A.R.H., de México, se observó un 100% de protección, cuando se utilizó una dosis de desafío capaz de matar al 100 % de los cerdos controles no vacunados; con cada uno de los lotes comerciales de la vacuna PAV-250, que han sido liberados, se han obtenido resultados similares; b) en las otras pruebas, realizadas de acuerdo con el procedimiento para pruebas de potencia, establecido por el Depto. de Agricultura de los E.U.A., se han observado resultados similares; c) en las pruebas de campo realizadas en la granja que tenía brotes continuos de FPC, se observó que en los cerdos vacunados con una dosis, hubo un 90 % de protección; en los que fueron vacunados con dos dosis de

la vacuna (4 ml), en una sola aplicación, se observó un 100 % de protección; mientras que en los cinco cerdos dejados como controles no vacunados, se observó un 40% de mortalidad. Esta última mortalidad fue producida a causa de la infección por el virus virulento de FPC que estaba establecido en la granja, y que en ese momento estaba produciendo brotes en diferentes puntos de la granja; en éstos cerdos controles se observaron signos clínicos y lesiones de FPC, y el virus fue aislado e identificado por la prueba de anticuerpos fluorescentes.

**Antigenicidad.** - a) Los cerdos vacunados experimentalmente con dos dosis de vacuna, antes de ser vacunados, no mostraron títulos de anticuerpos sueroneutralizantes, al diluir su suero 1:4; pero a los 21 días después de la vacunación se estimularon títulos de anticuerpos, los cuales variaron de 1:4 a 1:256 (promedio 1:48); y a los 21 días después del desafío con el virus virulento Ames de FPC, se obtuvieron títulos promedio de 1:853 en los sobrevivientes.

Con respecto a los cerdos localizados en la granja que tenía brotes continuos de FPC, poco antes de aplicar la vacunación con una sola dosis, se detectaron títulos de anticuerpos sueroneutralizantes maternos, que en promedio eran de 1:16; y a los 21 días después de la vacunación (antes de ser desafiados), hubo títulos de 1:16 a 1:256 (promedio 1:131); se observó con un 90. % de protección, ante el desafío natural con la "Cepa" de campo; en el lote vacunado con doble dosis de vacuna, se desarrollaron títulos de anticuerpos de 1:16 a 1:256 (con un promedio de 1:102); y se obtuvo un 100 % de protección ante la exposición en condiciones naturales. En estas mismas condiciones se observó un 40 % de mortalidad en los cinco controles no vacunados.

**No difusión.** - En todas las pruebas realizadas para investigar si había diseminación del virus vacunal, siempre se observó que sobrevivieron el 100 % de los vacunados, mientras que siempre hubo un 100 % de mortalidad en los cerdos que no habían sido vacunados, y que habían sido mantenidos en contacto con los cerdos vacunados; estos cerdos contacto mostraron signos clínicos y lesiones típicas de FPC, y el virus fue aislado, y el antígeno identificado por la prueba de anticuerpos fluorescentes (AF).

**Producción de la semilla.** - Se encontró que mediante la irradiación con rayos Gamma (Co-60), inactivación a 56 C, y ultrafiltración del suero comercial, se logró mantener a las células PK-15 libres de contaminación por el virus de Diarrea Viral Bovina (DVB). Y cuando se utilizaron éstas células, libres de contaminación por DVB, en la producción de la semilla, utilizando el estabilizador adecuado, fue posible producir lotes de semilla con altos títulos ( $10^8/2$  ml). En esta forma se logró desarrollar una técnica adecuada para la producción industrial de la vacuna PAV-250, con altos títulos y libre de contaminación por DVB. Por otra parte, después de darle cinco pases a la semilla, en células PK-15, se observó que la vacuna no perdió sus propiedades.

cuando se probaron de nuevo sus características de inocuidad, potencia y no difusión.

Vacunación de cerdos lactantes.- Después de la vacunación no se observó ningún signo clínico, en los lechones lactantes de uno, siete, 15 y 21 días de edad.

En el Grupo 1 (vacunado cuando tenía un día de edad) después del desafío, cinco de los nueve cerdos vacunados mostraron un aumento en su temperatura rectal; dos de ellos durante un día (40.5 C y 41.1 C, respectivamente); uno durante tres días (promedio 40.4 C); uno durante cinco días (promedio 41.2 C); uno durante seis días (40.3 C); tres de éstos cerdos presentaron tristeza durante los días en los que les aumentó la temperatura rectal, y después se recuperaron y ninguno de ellos murió. Por su parte, todos los lechones lactantes, que fueron dejados como controles en cada grupo, presentaron signos clínicos típicos de FPC y el 100 % de ellos murió, mostrando lesiones típicas de FPC y la presencia del antígeno de FPC fue demostrado en sus tejidos, por la prueba de anticuerpos fluorescentes.

El Grupo 2, vacunado cuando tenían siete días de edad, no presentó aumento en su temperatura rectal después de la exposición; sin embargo, tres de los siete cerdos expuestos, mostraron una ligera tristeza, después de la exposición, durante cuatro días.

En el Grupo 3, vacunado cuando tenían 15 días de edad, después de la exposición, uno de los ocho cerdos presentó ligera hipertermia (40.5 C), durante un día; y otro (40.1-40.2 C) durante tres días; y se observó un 100 % de protección.

En el Grupo 4, vacunado cuando tenían 21 días de edad, después del desafío, solamente un cerdo de los nueve vacunados, mostró un ligero aumento en su temperatura rectal (40.2-40.4 C), durante tres días. Y el 100 % de ellos sobrevivió.

Control de brotes activos de FPC mediante la vacunación masiva.-

Al vacunar, y/o revacunar, a todos los animales de las granjas porcinas que tenían brotes continuos de FPC, no se presentaron reacciones indeseables en los animales vacunados, sin importar el sexo, raza, edad o estado de gestación. Y se observó que a partir de los cinco o siete días después de la vacunación de cada sección de la granja, en la sección correspondiente no se presentaron nuevos casos de esta enfermedad, en los cerdos vacunados (Correa, Ramirez y Rodriguez, no publicado).

Discusión.- En las pruebas oficiales realizadas en condiciones controladas, la vacuna contra la FPC, preparada con la semilla PAV-250, demostró una inocuidad y potencia satisfactorias, y se caracterizó por no diseminarse.

La vacunación con una dosis, no produjo signos clínicos detectables, ni alteraciones en el conteo total de glóbulos blancos, ni en la temperatura rectal. La vacunación con dos o con cinco dosis de vacuna, produjo una mínima disminución en el conteo total de glóbulos blancos, en tres (21.4 %) (10,500; 9,100; y 10,500/ mm<sup>3</sup>) de los 14 cerdos vacunados; y solamente dos (14 %) de estos 14 cerdos mostraron un muy ligero aumento en su temperatura rectal (40.5 C), durante el 4° y 14° días después de la vacunación. Sin embargo, estos cerdos continuaron comiendo y no mostraron signos clínicos de FPC.

Con relación a los varios millones de cerdos vacunados en condiciones de campo, no se nos han comunicado reacciones postvacunales adversas, ni fallas de vacunación.

Todos los cerdos vacunados que han sido estudiados, han mostrado respuestas serológicas, con títulos de anticuerpos seroneutralizantes, desde 1:4 hasta 1:250.

Cuando el suero utilizado para la preparación de los cultivos celulares fue inactivado con rayos Gamma, calentado a 56 C por 30 minutos y ultrafiltrado, la semilla producida fue obtenida con títulos de 10.<sup>6</sup>/ 2 ml (9, 10), y se mantuvo libre de contaminación por el virus de DVB (9, 10).

Los lechones lactantes vacunados a uno, siete, 15 y 21 días de edad, no mostraron alteraciones clínicas después de la vacunación, y el 100 % sobrevivieron ante una dosis de exposición capaz de producir signos clínicos de FPC y mortalidad en el 100 % de los controles. Después del desafío, cinco de los nueve lechones vacunados cuando tenían un día de edad, mostraron un aumento en su temperatura rectal (de 40.3 a 40.5 C), durante uno o varios (?) días, mientras que uno presentó un promedio de temperatura rectal de 41.2 C, durante cinco días. Algunos de ellos mostraron tristeza durante los días en los que les aumentó la temperatura, pero continuaron comiendo y no se observó ningún otro signo; y se recuperaron; y ninguno de ellos murió. Una situación más o menos similar fue observada en tres de los siete cerdos del Grupo 2, los cuales mostraron tristeza pero sin presentar aumento en su temperatura rectal; y lo mismo sucedió en dos de los ocho cerdos del Grupo 3 y en uno de los ocho del Grupo 4. En estos últimos dos grupos, solamente se observó un ligero aumento en la temperatura rectal (de 40.1 a 40.5 C), durante uno o tres días. Y todos ellos también se recuperaron, y el 100 % sobrevivieron ante el desafío.

En las granjas en las que en ese momento se estaban presentando brotes de FPC, mediante la vacunación y/o revacunación masiva de todos los animales, con la vacuna PAV-250, se logró controlar cada uno de los cinco brotes estudiados. En una de las granjas estudiadas, se continuó vacunando durante un año y medio, y no se volvieron a presentar brotes de esta enfermedad.

## LITERATURA CITADA :

- 1.- Baker, J. A.; and B. E. Sheffy (1960): **A Persistent Hog Cholera Viremia in Young Pigs**, Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med., 105; 675-678.
- 2.- Baker, J. A. (1946): **Serial Passage of Hog Cholera Virus in Rabbits**, Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med., 63; 183-187.
- 3.- Correa G., P.; J. A. Baker, B. E. Sheffy; M del C. Ochoa y N. Mancisidor (1975): **Una nueva vacuna mejorada para controlar el Cólera del cerdo**, Tec. Pec. en Méx., 29; 34-40.
- 4.- Dirección General de Salud Animal (1977): **Departamento de Control de Productos Biológicos, Farmacéuticos, Alimenticios y Equipos para Animales**. S-1; 1 a 1.3.3.
- 5.- Gillespie, J. H.; B. E. Sheffy, and J. A. Baker (1960): **Propagation of Hog Cholera Virus in Tissue Culture**, Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med., 105, 679-681.
- 6.- Gillespie, J. H.; B. E. Sheffy; L. Coggins; S. H. Madin; and J. A. Baker (1961): **Propagation and Attenuation of Hog Cholera Virus in Tissue Culture**, Proc. U.S. Livestock San. A., 65; 1-7.
- 7.- United States Department of Agriculture (1966): **Standard Requirements for Biological Products, 1703, 1704, 1707 Standard Requirements for Hog Cholera Vaccine, Modified virus, U.S.D.A., V-6, June 15.**
- 8.- Snyder, M. L., Eernisse, K. A. and Erickson, G. A. (1981): **Fluorescent Antibody Neutralization Test for the Detection of Hog Cholera (HC) and Bovine Viral Diarrhea (BVD) Antibodies**, In: Serologic Microtitration Techniques, U.S. Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service, Veterinary Services, National Veterinary Services Laboratories, Ames, Iowa, June, 1981, pp. 40-42.
- 9.- Correa G., P., Rodríguez S., B.; Martínez, A. (1984): **Producción de la vacuna PAV-250 contra el Cólera Porcino con cinco títulos, utilizando células PK-15 libres de contaminación por Diarrea Viral Bovina (BVD) y suero irradiado y ultrafiltrado**. V Simposium sobre Química Nuclear, Radioquímica y Química de Radiaciones. Salón del Consejo de la Universidad de Guanajuato, Gto. México, D.F. diciembre 4-7, p. 57.
- 10.- Correa G., P.; Rodríguez S. B.; Romero R., C.; Torres C., G.; Sánchez H., C.; Snyder, M. (1984): **Prevención de la contaminación de los cultivos celulares (CC) por el virus de la Diarrea Viral Bovina (BVD) mediante la inactivación con gammas a 25 KGy y por ultrafiltración del suero fetal de ternera comercial**

(SFTC) utilizado en los medios de cultivo. V Simposio sobre Química Nuclear, Radioquímica y Química de Radiaciones. Salón del Consejo de la Universidad de Guanajuato, Gto. México. Diciembre 4-7. p. 58.

11.- Solerzano, R. F., Thigpen, J. E., Bedell, O. M. et Schwartz, W. L. (1966). The Diagnosis of Hog Cholera by fluorescent antibody test. J. Am Vet. Med. Assn., 149 (1), pp. 31-34.

12.- Díaz G., A.; Ochoa, M. del C., Mancisidor, N., Snyder, M.L. Cornea, G. P., 1977. Producción y evaluación de un conjugado para detectar virus de Cólera Porcino. Mem. I Cong. Lat. de Vet. Esp. en Cerdos. XIII Conv. AMVEC. Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Xochimilco. México. D.F. del 6 al 10 de septiembre.