

AGRINTE R

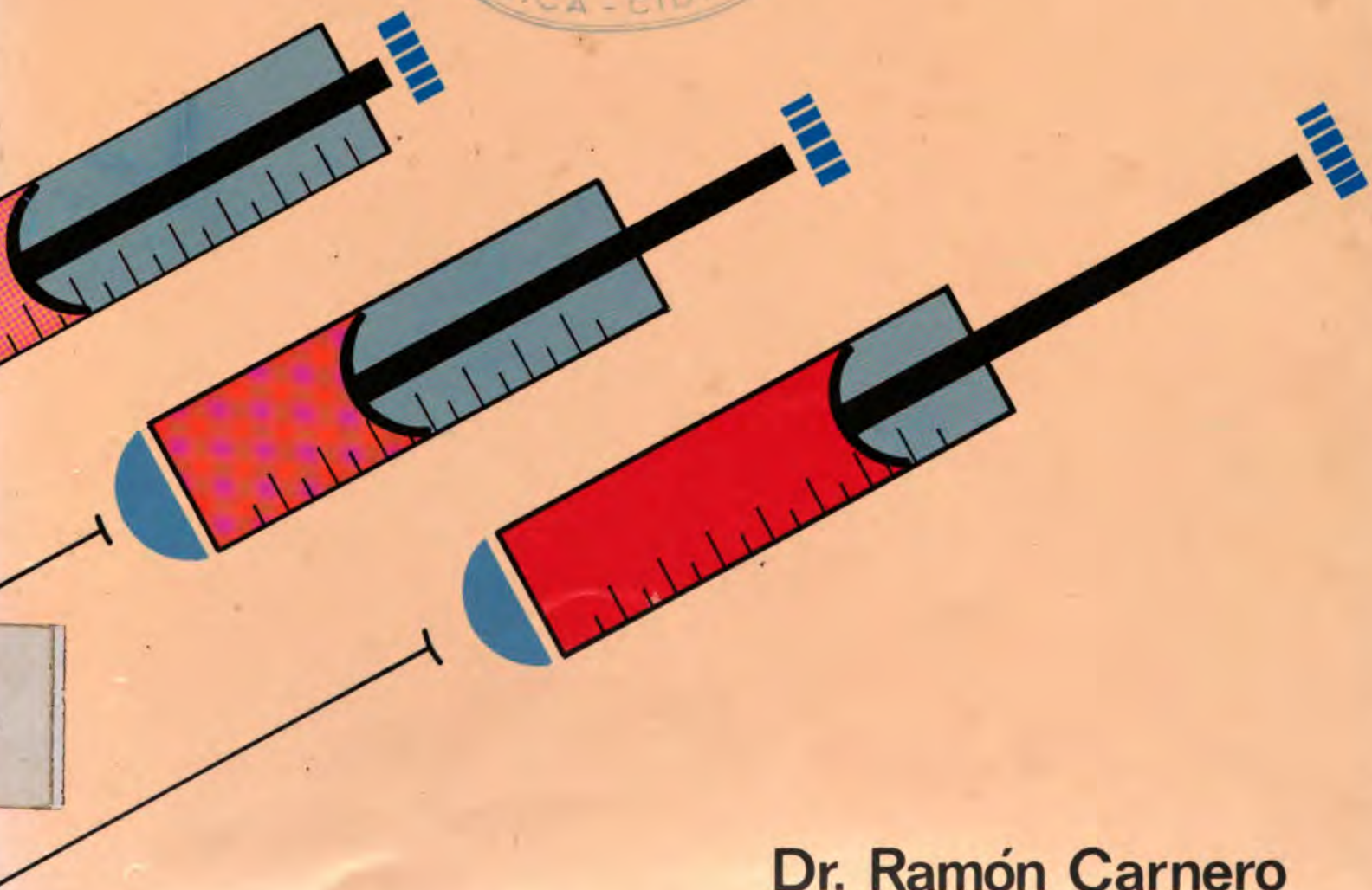
IICA
SAPC-

AGRINTE-AGRI

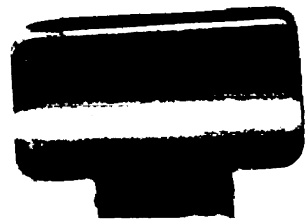
SERIE: SALUD ANIMAL, PUBLICACION CIENTIFICA No. 3

fiebre **PORCINA** africana

BIBLIOTECA
- 2 SET, 1992
Centro Informacion de Recursos
e Informacion Agraria
IICA - CIDIA



Dr. Ramón Carnero



SERIE: SALUD ANIMAL, PUBLICACION CIENTIFICA No. 3

fiebre PORCINA africana



Ramón Carnero

*Jefe de Servicio y Coordinador de
la Patología Porcina*



INSTITUTO INTERAMERICANO DE COOPERACION PARA LA AGRICULTURA

DIRECCION DE SALUD ANIMAL – SAN JOSE, COSTA RICA – 1982

© Ramón Carnero
© para esta edición, IICA, 1982

Prohibida la reproducción total o parcial de esta obra sin permiso del Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura.

Levantado de texto: Yadira González Mora
Diseño de la cubierta: Guillermo Marín M.
Editor de la Serie: Dirección de Salud Animal

00001748

001587

**IICA
SAPC-3**

Carnero, Ramón

Peste porcina africana : conocimiento de la enfermedad. — San José, Costa Rica : IICA, 1982.

244 p. — (IICA : Serie salud animal, publicación científica ; 3 : patología porcina ; I)

ISBN 929039-041-7

1. Cerdos — Enfermedades. 2. Fiebre Porcina Africana. I. Título. II. Serie.

AGRIS L73



DEWEY 636.4089692

**Serie: Salud Animal, Publicación Científica No. 3
ISBN 929039-041-7**

Esta serie recoge trabajos científicos inéditos presentados por consultores especializados en diferentes campos de la salud animal a REDISA, Reunión Interamericana de Directores de Salud Animal así como otras valiosas aportaciones sobre el tema, consideradas importantes fuentes de consulta.

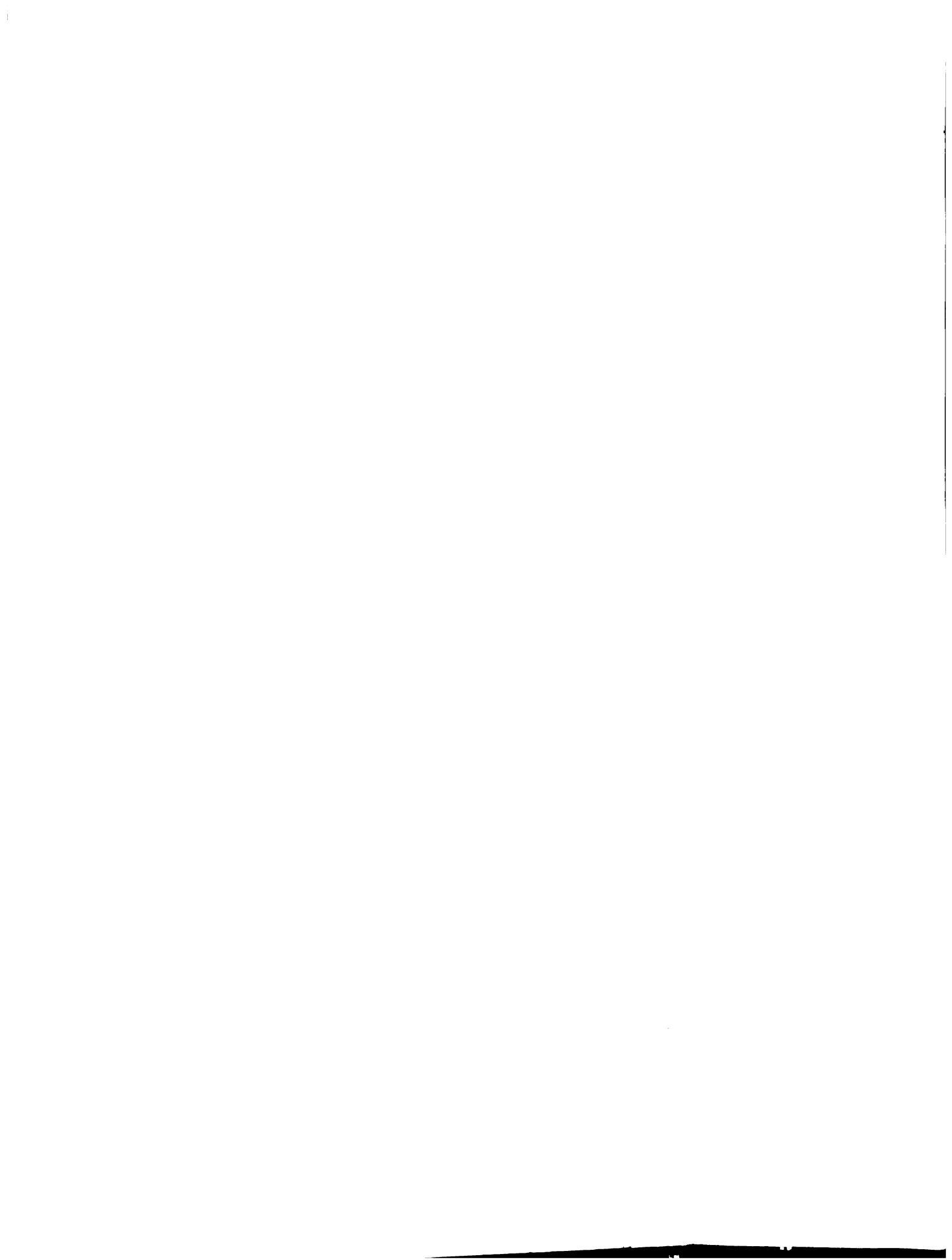
San José, Costa Rica, 1982

SERIE TECNICA DE SALUD ANIMAL DEL IICA
PATOLOGIA PORCINA (I) Nº 3

PESTE PORCINA AFRICANA
CONOCIMIENTO DE LA ENFERMEDAD

Dr. Ramón Carnero
Jefe de Servicio y Coordinador de
la Patología Porcina
Laboratoire Central de Recherches
Veterinaires
Direction de la Qualite
Santé Animale
Ministere de l'Agriculture
Francia

Consultor del Programa de Salud
Animal del IICA



LA PESTE PORCINA AFRICANA

Primera parte : Conocimiento de la enfermedad
Páginas 1 a 92.

Segunda parte : Anexos Técnicos
Páginas 93 a 190.

Tercera parte : Bibliografía
Páginas 191 a 235.

I N D I C E

	PRESENTACION	1
I	INTRODUCCION	2
II	ETIOLOGIA	4
	PROPIEDADES DEL VIRUS	
	1. Físico-químicas	6
	2. Biológicas	8
	A Poder patógeno	8
	a- Natural	9
	b- Experimental	11
	B Poder antígeno	15
III	EPIZOOTIOLOGIA	
	1. Factores epizootiológicos	16
	A Fuente del virus	16
	B Resistencia	22
	C Receptividad	22
	D Vías de contagio	22
	E Formas de contagio	22
	2. Epizootiología de la PPA.	24
IV	LESIONES	28
	1. Anatómo-patológicas	28
	2. Histo-patológicas	31
V	PATOGENIA	37
VI	SINTOMAS	38
VII	DIAGNOSTICO	40
	1. Muestras	42

	2. Experimental	43
	A Identificación viral	44
	B Detección de anticuerpos	61
VIII	PRONOSTICO	68
IX	TRATAMIENTO	68
X	PROFILAXIA	
	1. Médica	70
	2. Sanitaria	73
	A Protección de los animales sanos	74
	B Identificación de enfermos	76
	C Destrucción del foco	82

I N D I C E D E A N E X O S

- ANEXO I Cultivo de Tejidos: Elementos de base.
- 1 Composición de las principales Soluciones Tamponadas
 - 2 PBS.
 - 3 Hank's
 - 4 Earle
 - 5 Solución de Rojo de Fenol
 - 6 Antibióticos y Fungicidas
 - 7 Medio de Cultivo MEM
 - 8 Medio de cultivo de Leucocitos de Cerdo
 - 9 Solución de Cristal Violeta
 - 10 Solución de Tripsina - Versene
 - 11 Cámaras de recuento celular
 - 12 Conservación de células en Nitrógeno líquido
 - 13 Solución de Alsever
- ANEXO II Cultivo de Tejidos: Técnicas de cultivo.
- 1 Cultivo de la Línea PK 15
 - 2 Cultivo de la Línea VERO
 - 3 Cultivo de Leucocitos de Cerdo
 - 4 A partir de sangre por sedimentación
 - 5 A partir de sangre por defibrinación
 - 6 A partir de médula ósea
- ANEXO III Cultivo de Tejidos: Coloración, observación.
- 1 Coloración de Giemsa
 - 2 Coloración de Feulgen
 - 3 Coloración de Anaranjado de Acridina
 - 4 Inmunofluorescencia
 - 5 Preparación de suero inmune PPA.

- 6 Extracción de IgG del Suero
- 7 Conjugación con ITCE
- 8 Glicerina Tamponada
- 9 Microscopia de luz Ultravioleta
- 10 Luz Transmitida
- 11 Esquema
- 12 Luz Reflejada
- 13 Esquema

ANEXO IV

Diagnóstico.

- 1 Ficha para la demanda de Análisis
- 2 Muestras
- 3 Preparación de Inóculos

Diagnóstico Experimental sobre Animales

- 4 Por inoculación al cerdo, diferencial PPA/PPC
- 5 Por inoculación al conejo, PPC

ANEXO V

Diagnóstico Experimental sobre Cultivo de Tejidos.

Identificación Viral

- 1 IF sobre órganos
- 2 Hemoabsorción
- 3 IF sobre cultivos de leucocitos
- 4 Gel-Precipitación

ANEXO VI

Diagnóstico Experimental.

Detección de Anticuerpos

- 1 Inmunofluorescencia Indirecta
- 2 Preparación del Antígeno Soluble
- 3 Inmuno-Electro-Osmo-Foresis
- 4 ELISA
- 5 Inhibición de la HAD
- 6 Inmunodifusión Radial
- 7 Fijación del Complemento

ANEXO VII

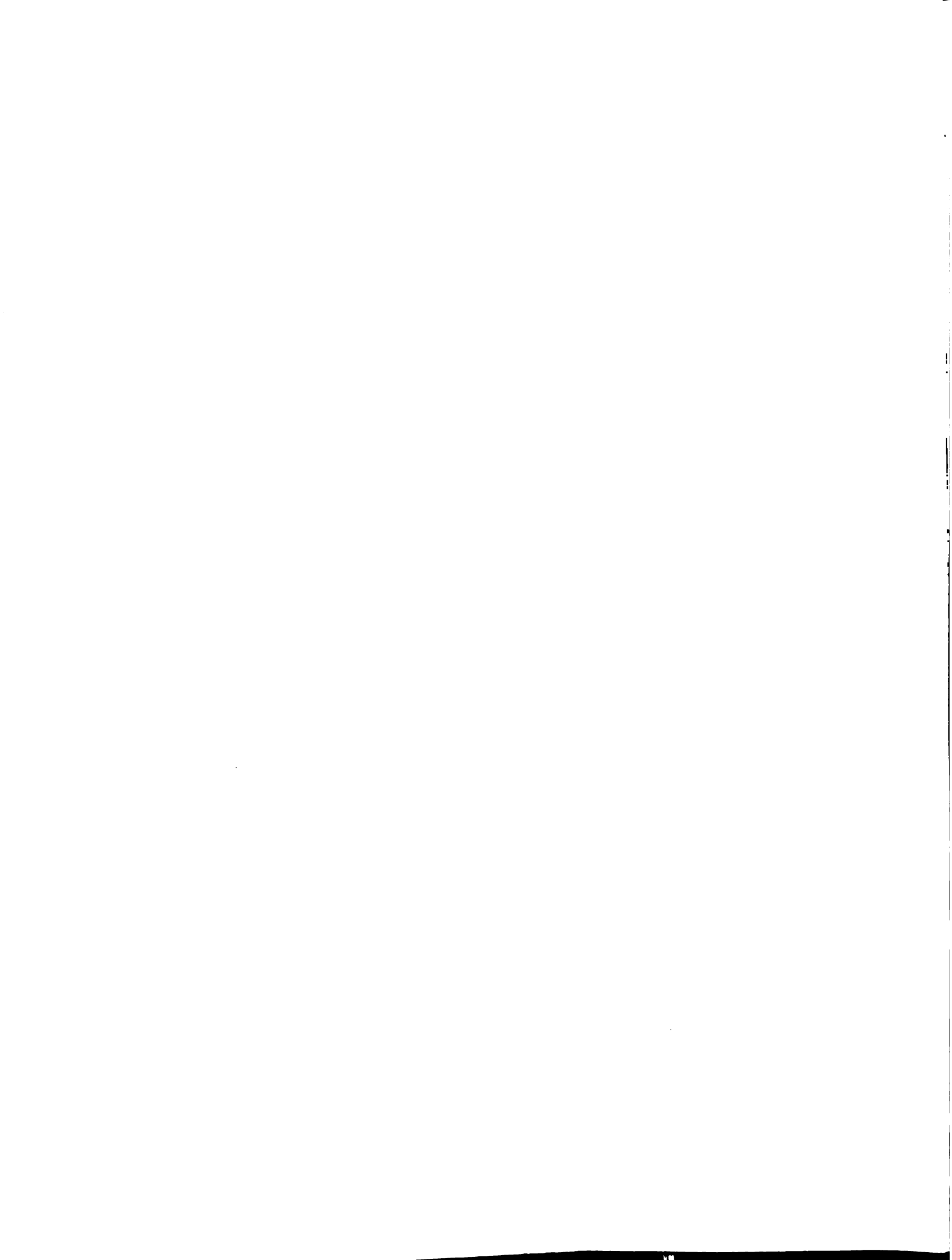
Cálculos.

- 1 Título de una suspensión viral.
- 2 Método de Reed & Muench
- 3 Método de Spearman & Karber
- 4 Ajuste de dosis por unidad de volúmen
- 5 Cálculo de diluciones

ANEXO VIII

Diversos.

- 1 El Ornithodorus, clasificación
- 2 Ciclo Evolutivo
- 3 Imágen de Perfil
- 4 Imágen Dorsal
- 5 Imágen Ventral



CONOCIMIENTO DE LA ENFERMEDAD



PESTE PORCINA AFRICANA

CONOCIMIENTO DE LA ENFERMEDAD

El objeto de esta monografía es dar a conocer a los colegas veterinarios de América Central y del Sur, ciertos aspectos de esta terrible enfermedad, que puede catalogarse hoy día entre las más graves por los perjuicios económicos que ocasiona.

Así también está dirigida a los colegas veterinarios de América Latina en general; y más especialmente a aquellos que a niveles diferentes, tienen la responsabilidad de impedir el posible contagio de su país, así como de proyectar las medidas encaminadas a la rápida eliminación de la enfermedad si se constata un brote de la misma.

Voluntariamente, los puntos relativos a la investigación fundamental del agente causal, han sido tratados con menor intensidad que los aspectos aplicativos, técnicos o prácticos, puesto que por una parte son objeto de investigaciones constantes -luego no definitivos- y por otra parte son objeto de publicaciones sistemáticas en las revistas especializadas.

La idea directriz es pues, dar a conocer la enfermedad bajo sus múltiples aspectos, con el objeto de evitar el efecto de sorpresa que se produce en los primeros momentos de la invasión del País, efecto de sorpresa que disminuye la capacidad de reacción, en un período en el que ésta debería ser máxima.

Esta idea principal, ha sido adoptada después de considerar que: después de uno o dos años de lucha contra la enfermedad, las autoridades sanitarias y los colegas veterinarios están en posesión de una experiencia personal, superior a la que se puede transmitir en un libro, y en todo caso adecuada a las condiciones nacionales o locales en que el trabajo se ejerce.

Así al lado de medidas generales, que todos debemos conocer, aceptar y aplicar, hay una serie de medidas complementarias que se adoptan delante de situaciones precisas y que no son forzosamente iguales en un país industrializado que en un país de vocación agrícola; en un país en el que la industria porcina forma parte del patrimonio nacional, que en un país en el que representa un capital privado o en un país insular, que en un país continental, etc.

En resumen, la intención es transmitir una información lo más práctica, amplia y detallada que le pueda servir al lector como punto de partida para establecer su criterio personal.

PESTE PORCINA AFRICANA

Peste Porcine Africaine

Peste suina africana

Enfermedad de Montgomery

African swine fever

Afrikanische schweinpest.

La Peste Porcina Africana (P.P.A.), es una enfermedad viral, contagiosa y reproductible experimentalmente. Su huésped natural son los suidos salvajes o domésticos en los que se manifiesta con un cuadro patológico análogo al de la Peste Porcina Clásica (P.P.C.)

Fue señalada, por primera vez en 1921, en Kenya, por Montgomery.

Hasta nuestros días ha sido señalada con carácter mas o menos constante en: Angola, Africa Ecuatorial, Congo, Mozambique, Nyassaland, Rodesia, Senegal, Tanganika y Unión Sudafricana.

En 1957 se la identifica, por primera vez fuera del Continente Africano, en Portugal, que logró eliminarla.

En 1960 vuelve a hacer su aparición en Europa, esta vez en la totalidad de la Península Ibérica (España y Portugal) que es afectada sin que hasta nuestros días

Francia ha sufrido y ha eliminado la enfermedad en tres ocasiones: 1964, 1967 y 1974.

Italia padeció y eliminó la enfermedad en 1967.

La isla de Madera sufrió un primer ataque en 1966, que logró eliminar, pero una segunda invasión en 1974 presenta aún focos activos.

La primera vez que la enfermedad hizo su aparición en el Continente Americano fue en Cuba, en 1971, país que logró eliminarla rápidamente.

En 1978, hemos asistido a una expansión de la enfermedad que ha sido detectada en las islas del mar Mediterráneo, Malta y Cerdeña, así como en América: Brasil, Santo Domingo y Haití.

En resumen, la localización geográfica de la enfermedad al finalizar el año 1978 es la siguiente:

Países que han padecido la enfermedad y fecha de su último foco.

Africa:	Senegal, 1974	Benin, 1972
	Mozambique, 1974	Kenya, 1964
	Congo, 1975	Zambia, 1975
América:	Cuba, 1979	
Europa :	Italia, 1968	Francia, 1974.

Países que padecen la enfermedad y cantidad de focos en 1978.

Africa:	Sudán, dos focos	Angola, 29 focos
	Rodesia, un foco	Rep. Sud-Africana, 4 focos
	Isla de Madera, 30 focos	Malawi, focos esporádicos.

América:	Brasil, 214 focos	Santo Domingo, 283 focos
	Haittí, cantidad de focos no determinada.	
Europa :	Portugal, 2384 focos	España, 864 focos
	Isla de Cerdeña, 24 focos	Malta, cantidad de focos no determinada.

En 1979 la enfermedad hace una corta aparición en Cuba de donde es de nuevo eliminada.

Por último en 1981, la situación general tiende a mejorar, así se constata una fuerte regresión del número de focos en España y Portugal. En Cerdeña la disminución de la incidencia es igualmente notable. En Santo Domingo y en Malta, después de la eliminación de todos los cerdos del país, ninguna serología positiva ha sido señalada durante el proceso de repoblación. Cuba confirma con el empleo de cerdos "testigos" sobre el área saneada, la completa erradicación del virus de su territorio.

Brasil señala en 1981 dos casos de aislamiento de virus, cuando el aislamiento precedente remontaba a Agosto de 1979.

Por último Haittí inicia la campaña de lucha contra la enfermedad, por eliminación completa de los cerdos del país.

II ETIOLOGIA

Pese a la similitud de expresión patógena, entre los virus de la Peste Porcina Clásica (P.P.C.) y Africana (P.P.A.), su estructura y morfología, así como sus caracteres químicos, son completamente diferentes.

Entre las mayores diferencias encontramos las siguientes:

	P.P.A.	P.P.C.
Acido Nucleico	ADN	ARN
Tamaño	220 mu	40 mu
Simetría	Cúbica	Helicoidal, probable.

El virus de la P.P.A., es un virus ADN, de estructura icosaedrica y recubierto de una membrana.

En la sistemática viral encuentra su plaza al lado de la familia HERPESVIRIDAE, y ha sido propuesta la familia ASUPESVIRIDAE, que lo acogería como único representante.

Constantes físicas:

Tamaño : 200 - 220 mu

Velocidad de sedimentación : 1600 - 2600 g

Isodensidad en Cloruro de Cesio : 1'18 - 1'25

Isodensidad en Sucrosa : 1'19

Morfología

La envoltura del virus está compuesta por una membrana, que presenta un revestimiento externo y otro interno que recubre el "core" viral.

El microscopio electrónico revela que:

- El revestimiento externo está formado por sub-unidades de aspecto triangular fuertemente adheridas a la membrana.

- El revestimiento interno, está igualmente formado de sub-unidades de forma esférica y aspecto reticulado en su periferia

- El "core" viral está formado por una masa densa al paso de los electrones, adopta una forma esférica de 90 mu de diámetro, está aparentemente formado por una estructura fibrilar de 46 mu de diámetro.

Caracteres Químicos

Han sido aislados, a partir de la partícula viral completa:

- Una molécula de ADN de un peso molecular de 100×10^6 Daltons
- Cinco polipeptidos principales:

En la capsida	PV2	Peso Molecular	76×10^3 Daltons
	PV3	" "	50×10^3 Daltons
En la membrana	PV1	Peso Molecular	125×10^3 Daltons
	PV4	" "	44×10^3 Daltons
Probablemente asociado al ADN	PV5	" "	39×10^3 Daltons

A partir del virus intracelular han sido aislados 19 polipeptidos secundarios.-

PROPIEDADES DEL VIRUS DE LA P.P.A.

Sensibilidad a Diferentes Agentes Físico-Químicos

Un gran número de trabajos han sido dedicados a este tópico, pero los resultados obtenidos por los autores no son siempre concordantes. Estas diferencias son debidas a las diversas condiciones de experimentación, sobre todo en lo que se refiere al substracto protector del virus, su naturaleza y cantidad.

A título indicativo, podemos avanzar las cifras obtenidas con más frecuencia.

1. Agentes Físicos -Temperatura-

Frío: Resiste bien al frío, que es el principal agente conservador de su actividad. A 5°C se ha conservado durante siete años; temperaturas inferiores a cero prolongan esta conservación.

Temperatura ambiente (20-25°C), se le ha observado activo durante 18 meses.

Temperatura de Incubación (37°C), se le ha observado activo durante 30 días.

Temperatura de inactivación del suero (56°C), conserva su actividad durante más de 60 minutos.

A 60°C, se inactiva en 15 minutos.

PH:

Resiste más de 60 minutos a pH=3, siendo más sensible a las variaciones del pH en el sentido de la alcalinidad.

2. Agentes Químicos -Solventes Orgánicos-

Es sensible a la acción de los solventes de las grasas, como el éter y el cloroformo, que la inactivan en 15 minutos.

ENZIMAS:

Es resistente a la acción de la tripsina, empleada a 2'5 por ciento durante más de doce horas. Por lo que la tripsinación de un órgano de un enfermo, dará un cultivo infectado.

INACTIVANTES:

Es inactivado por la Beta-Propio-Lactona. Existen dudas serias sobre su inactivación por el cristal violeta, realizándose actualmente trabajos en este sentido.

DESINFECTANTES:

Es destruído por los desinfectantes de referencia empleados por la Legislación Francesa, para el control de los desinfectantes comerciales:

La Sosa a ocho por mil
 La lejía a un grado clorométrico
 El Fenol a tres por ciento
 El Formol a tres por ciento.

Estos desinfectantes le destruyen en treinta minutos a temperatura de laboratorio.

2. Propiedades Biológicas

Antes de pasar a la enumeración de las propiedades biológicas del virus, pasaremos revisión a la nomenclatura que vamos a emplear.

En primer lugar dividiremos el estudio en dos grandes líneas:

Una que deriva de su Poder Patógeno, la otra de su Poder Antigénico.

A. Poder Patógeno:

Es la capacidad del virus de producir una enfermedad específica sobre un animal susceptible y en un contexto dado.

A partir de esta definición, se estudian sistemáticamente una serie de propiedades que van a definir la enfermedad. Si el contexto animal + virus se sitúa en la naturaleza, estudiaremos el Poder Patógeno Natural. Si este contexto se sitúa al interior del laboratorio, estudiaremos el Poder Patógeno Experimental. Si dentro del Poder Patógeno Natural nos interesamos en las relaciones entre el virus y el animal, estudiaremos la Patogenicidad, que va a determinar los síntomas y las lesiones de la enfermedad. Si nos interesamos en las relaciones del virus con una población porcina, estudiaremos la agresividad que va a determinar los mecanismos de contagio, morbilidad y mortalidad que son la base de la Epizootología.

Si dentro del Poder Patógeno Experimental, nos interesamos en la respuesta de los sistemas reveladores vivos (animal o cultivo de tejidos), estudiaremos la Infecciosidad Viral, que puede ser espontánea o adquirida, según que estuviera o no presente en la cepa aislada en el campo. Por último el estudio cuantitativo de la multiplicación del virus constituye la Virulencia de la Cepa.

Una vez definidos estos conceptos, estudiaremos las particularidades concier - nientes a cada uno de ellos.

a. Poder Patógeno Natural

Patogenicidad:

1. Especies afectadas.

El virus se multiplica solamente en los suidos, siendo las especies domésticas y salvajes las únicas, entre los animales superiores, que permiten su multiplicación.

La distribución geográfica de los Suidos Salvajes es la siguiente:

Toda Europa salvo la parte Septentional, Asia, debajo del Paralelo 40; Toda Africa, menos el Desierto de Sahara, y son desconocidos en América donde la familia más próxima en la clasificación zoológica son los Taya Suidos.

La mayor variedad de especies de cerdos salvajes se encuentra en Asia:

Babirosa, en Malasia.

Diferentes especies de Jabalíes:

Jabalí de la India	(sus cristatus)	India
Jabalí Rayado	(sus vittatus)	Java, Sumatra, Borneo
Jabalí de Bigotes Blancos	(sus leucomystax)	China y Japón
Jabalí Verrucoso	(sus verrucosus)	Borneo
Jabalí Barbudo	(sus barbatus)	Borneo
Jabalí Enano	(sus Salvanius)	Asia Central.

Se desconoce completamente el grado de sensibilidad de estas especies asiáticas al virus de la P.P.A. En principio todos los representantes de la familia "sus", son susceptibles a la enfermedad, por lo que deberían ser sensibles a la multiplicación viral. La Babirosa, que pertenece a la familia Babirosae, pudiera comportarse de modo diferente.

En Africa los Suidos Salvajes están representados por tres grandes familias:

PHACOCHERO (*Phacochoerus aetnopicus*)

Habita la mayor parte de Africa; sabanas y selva densa son su habitat preferido. Se le encuentra frecuentemente en las madrigueras del Orycterope (Tubilidente, mamífero insectívoro).

HYLOCHERO (*Hylochoerus Meinertzhageni*)

Habita en el Congo y países limítrofes.

POTAMOCHERO (*Potamochoerus Porcus*)

Habita la selva húmeda y los bordes de casi todos los ríos africanos.

Estos Suidos Salvajes africanos son sensibles a la multiplicación del vi - rus de la P.P.A., pero esta multiplicación no les produce ningún trastorno aparen - te, así el animal "sano", puede ser un excretor de virus durante toda la vida.

En Europa, el cerdo salvaje está representado por una sola familia, el Jabalí (*sus scrofa ferus*). Se encuentra en todos los países de Europa, por debajo del paralelo 55 y en toda clase de terrenos, aunque prefiere las regiones húmedas y pantanosas, cubiertas de bosque y arbustos.

El Jabalí es sensible a la multiplicación del virus de la P.P.A. Esta multiplicación va acompañada de un síndrome patológico análogo a la enfermedad manifestada por el cerdo doméstico.

LOS CERDOS DOMESTICOS (*sus scrofa domesticus*)

Se encuentran prácticamente en todos los países del mundo.

Son sensibles a la multiplicación del virus de la P.P.A. y esta multiplica - ción se exterioriza por el síndrome patológico conocido bajo el nombre de P.P.A.

Todas las razas conocidas, sin distinción de sexo ni edad son igualmente sensibles a la acción viral.

Otros mamíferos, así como las aves, no son sensibles de forma natural a la multiplicación del virus.

a) Tejidos afectados.

El virus tiene un tropismo preferencial por el sistema retículo endotelial, donde su multiplicación produce las lesiones, que serán descritas más tarde.

b) Agresividad:

La contagiosidad del virus es muy variable, por lo que es uno de los caracteres más difíciles de determinar. En líneas generales posee una contagiosidad suficientemente elevada para producir verdaderas ondas epizooticas pero no es tan fuerte ni tan rápida como la producida por otros virus (fiebre aftosa, gripe o gastroenteritis transmisible).

La morbilidad es elevada y puede oscilar entre 80 y 100 por ciento del efectivo de una cochiguera.

La mortalidad es igualmente elevada, y en su evolución normal puede alcanzar entre 80 y 100 por ciento de los afectados. Pero estos caracteres son extremadamente variables pues la población viral parece ser sumamente heterogénea, por lo que las cifras indicadas a título de orientación y no como una constante inamovible.

b. Poder Patógeno Experimental

Como en el caso del Poder Patógeno Natural, la única especie animal sensible a la multiplicación del virus como consecuencia a su inoculación, es el cerdo.

La inoculación del virus, prácticamente por todas las vías experimentales empleadas va seguida de la multiplicación viral. De forma habitual, la vía experimental es la intramuscular.

No se tienen noticias de cepas que hayan adquirido infecciosidad constante para otras especies. Algunos casos han sido señalados en la literatura, pero estos

casos se asemejan más a variaciones ocasionada que a verdaderas transformaciones de la infecciosidad del virus.

La infecciosidad natural "in vitro", se manifiesta exclusivamente sobre el cultivo de leucocitos de cerdo.

Las adaptaciones a otros sistemas celulares son posibles y estables. Así, se ha obtenido a través de diversos procesos de adaptación, cepas de virus que se multiplican en diferentes cultivos, en los que producen lesiones y lysis de manera constante.

Los cultivos más empleados para la obtención de esta infecciosidad adquirida, son los logrados a partir del riñón de cerdo o de mono, tanto en primera explantación como en líneas celulares. De forma general estas adaptaciones modifican la infecciosidad "in vivo", pero sin llegar a eliminar en forma completa el poder patógeno del virus.

La multiplicación del virus sobre el cultivo de tejidos, de forma general y más particularmente sobre el cultivo leucocitario, se manifiesta por una serie de alteraciones visibles al microscopio.

Estas alteraciones son:

Lesiones Nucleares - Densificación de la cromatina
Picnosis perinuclear
Lysis.

Estas lesiones no son específicas del virus de la P.P.A.

Lesiones Citoplasmáticas

- Inclusión tipo A de Cowdry Lysis

La inclusión es específica y observable por inmunofluorescencia.

Alrededor de la célula

- Presencia de una o varias coronas de hematies,

rodeando el citoplasma.

Esta hemoadsorción es específica de la multiplicación del virus de la P.P.A.

En efecto, los primeros signos de infección en el cultivo de leucocitos se traducen generalmente, por una retracción del citoplasma, lo que da a la célula un aspecto circular que contrasta con el polimo-fismo de las células no infectadas. Un escaso número de células infectadas guarda su aspecto fusiforme hasta el final de la infección.

Las primeras inclusiones citoplasmáticas que hemos podido observar, se sitúan alrededor de cuatro horas después de la infección en ciclo único. En este mismo espacio de tiempo se manifiestan las lesiones nucleares, que se inician por una densificación de la cromatina.

La inclusión del citoplasma y la lesión del núcleo evolucionan en forma paralela, así la inclusión aumenta de tamaño adquiriendo formas redondeadas o riniformes aproximadamente de 5 micras de diámetro, mientras que la cromatina se agrupa en gránulos cada vez más densos que se localizan de preferencia en la periferia de la membrana nuclear. La hemoadsorción se manifiesta de forma secundaria con respecto a la aparición de las inclusiones, así se perciben las primeras imágenes entre 6 y 8 horas después de la inoculación.

Existe una correlación directa entre la aparición de estas imágenes y la multiplicación del virus pudiéndose observar un estrecho paralelismo entre las curvas representando la cantidad de células infectadas y el título del virus en el sobrenadante del cultivo.

Un fenómeno de lysis de núcleo precede la lysis del citoplasma, que va seguida de la destrucción celular manifestándose por la desaparición casi completa de las células del cultivo, dos o tres días después de la presentación de la hemoadsorción.

La virulencia del virus se estudia por titulaciones realizadas a partir del material objeto de estudio.

Estos títulos se realizan, habitualmente sobre el cultivo de leucocitos.

A título indicativo señalaremos que: Una cepa de virulencia normal sobre un cultivo de leucocitos, se multiplicará hasta dar un título en el sobrenadante de 10^{-6} dosis hemoadsorbentes, 50% por 0'2 c.c.; In Vitro, los títulos obtenidos sobre tres animales inoculados experimentalmente con una cepa de agresividad normal y por un c.c. de inóculo se resumen en el cuadro siguiente:

ORGANOS	C E R D O S		
	I	II	III
Bazo	$10^{-8'0}$	$10^{-8'6}$	$10^{-8'0}$
Ganglios Gástricos	$10^{-8'0}$	$10^{-8'0}$	$10^{-7'5}$
Hígado	$10^{-6'0}$	$10^{-7'0}$	$10^{-7'2}$
Pulmón	$10^{-8'0}$	$10^{-8'0}$	$10^{-7'5}$
Cerebro	$10^{-7'0}$	$10^{-6'7}$	$10^{-6'0}$
Riñón	$10^{-6'0}$	$10^{-6'0}$	$10^{-5'0}$
Psoas	$10^{-5'0}$	$10^{-6'0}$	$10^{-4'5}$
Páncreas	Negativo	Positivo	Negativo
Sangre	Positivo	Positivo	Positivo
Orina	Positivo	Positivo	Positivo
Heces	Negativas	Positivas	Negativas

B. Poder Antígeno

Es la capacidad del virus de inducir en el cerdo, la formación de anticuerpos específicos.

Unos cuantos de estos anticuerpos, pueden ser revelados "in vitro" por las técnicas serológicas, lo que nos obliga a diferenciar dos conceptos frecuentemente confundidos. El término respuesta inmunizante, corresponde a la respuesta total del cerdo local, general, tisular, humoral, etc., de la que solo una parte podrá ser revelada por las técnicas serológicas apropiadas, lo que constituirá la respuesta serológica.

El virus de la P.P.A. posee un elevado poder antigénico, e induce en el cerdo una respuesta rápida y elevada de anticuerpos, pudiendo identificarse algunas de ellas desde el quinto al séptimo día después de la inoculación.

Los principales anticuerpos identificados son:

- . Precipitantes en agar, revelables por Ourchterlony, Inmuno-electro-osmo-foresis e Inmunodifusión radial.
- . Fijadores de Complemento.
- . Inhibidores de la H.A.D.
- . Revelables por las técnicas de inmunofluorescencia, Inmunoperoxidasa o ELISA.

No han sido identificados ni anticuerpos neutralizantes de la acción viral "in vitro" ni protectores "in vivo".

No han sido señalados fenómenos de inmunidad cruzada "in vivo", con ningún otro virus en general, ni con el de la P.P.C. en particular.

No existe serología cruzada con ningún otro virus en general, ni con la P.P.C. en particular.

La técnica de inhibición de la H.A.D. y al parecer solamente ella diferencia serológicamente dos tipos de virus, todas las cepas aisladas en Europa así como la de Cuba en 1971, pertenecen a un mismo serotipo. Solamente la cepa de Portugal de 1957 pertenecería al segundo grupo.

III. EPITZOOTIOLOGIA

Para una mayor claridad de exposición, la dividiremos en dos partes.

En la primera consideraremos los factores epizootiológicos:

A. Fuentes del Virus:

Animales enfermos

Cerdos portadores

Artrópodos portadores

Vectores pasivos

Objetos contaminados

B. Resistencia del virus:

Formas de contagio (directo e indirecto)

Vías de contagio

En la segunda consideraremos los aspectos propios de la epizootiología de la P.P.A. así como las formas por ella adoptadas en los diferentes países afectados

1. Factores Epizootiológicos

A. Fuentes del Virus:

Animales enfermos y las sustancias virulentas que de ellos proceden.

Como corresponde a una enfermedad de carácter septicémico, deben ser consideradas como sustancias infectadas todas las secreciones y excreciones del animal enfermo.

Un estudio " a profundi " deberá realizarse sobre la presencia del virus en el semen de los animales enfermos, pues esta secreción, a favor de las técnicas

cada día más empleadas de la inseminación artificial, posee una gran importancia económica y puede representar un factor importante de diseminación de la enfermedad a gran distancia en el espacio y en el tiempo.

Saliva, lagrimas, moco nasal, orina, heces y sobre todo la sangre (en el caso de epistaxis y melenas) constituyen un material altamente contagioso.

La carne fresca es igualmente virulenta, la rigidez cadavérica y la disminución de pH consecutiva, no modifican la cantidad de virus presente en el canal, dado su resistencia al pH ácido.

La carne refrigerada o congelada, conserva plenamente la actividad viral, permitiendo aislar el virus después de cinco meses de refrigeración.

Dada la diversidad de preparados en charcutería, es difícil poder hacerse una idea de la resistencia del virus en cada una de estas conservas. Se sabe que el virus ha sido aislado del jamón ahumado, después de cinco-seis semanas de su preparación.

Un estudio sistemático de los productos de charcutería más corrientes, debería ser realizado a escala internacional.

Cerdos Portadores: son aquellos aparentemente sanos que albergan el virus en su organismo y le eliminan de forma intermitente.

Se deben diferenciar dos tipos de portadores: el portador precoz que corresponde al cerdo en período de incubación. Generalmente se admite que el animal no es excretor hasta la aparición de la fase febril, pero ha sido descrito y hemos podido comprobar personalmente que 24-48 horas antes de la primera manifestación febril, el virus está presente en la sangre a títulos elevados lo que deja suponer su posible eliminación en este período.

Otro tipo de portador es el cerdo convaleciente o "curado" pues en la mayoría de los casos el virus continúa multiplicándose y eliminándose en ausencia de síntomas durante la vida del animal.

Otro tipo de portador sano y reservorio ancestral del virus, está representado por los suidos salvajes africanos, ya mencionados, en los que el virus se multiplica, igualmente, en ausencia de síntomas.

Artrópodos Portadores son aquellos en los que el virus se multiplica en forma natural, como es el caso del Ornithodoros, vulgarmente conocido según las regiones, con los nombres de chinchorro o garrapata. El contagio que producen estos animales es una verdadera inoculación del virus por vía parentenal, en el momento de su alimentación hematófaga.

Dada la importancia que estos artrópodos pueden tener en el caso de recontaminación de fincas infectadas y desinfectadas; y el desconocimiento relativo de este género de ectoparásitos, vamos a estudiarlos brevemente.

Remontando en la sistemática parasitaria, encontramos la clase Arachnoidea (cuerpo dividido en dos partes, cefalotórax y abdomen, sin alas, sin antenas, dos pares de apéndices bucales y cuatro pares de patas en el cefalotórax).

Esta clase se divide en nueve ordenes entre ellos el Acarina, que da origen a dos sub-órdenes -sarcoptoidea e ixodoidea. Los ixodoidea se dividen en dos familias: Ixodidae y Argasidae. Los ixodidae se dividen en tres sub-familias -ixodidae, rhipicephalinae y amblyominae-. Los Argasida se dividen en dos géneros argas y ornithodoros.

Todos ellos están representados en los tratados de enfermedades parasitarias más bien como ectoparásitos estrictos, que como agentes de transmisión de enfermedades infecciosas, siendo la más frecuente, por ellos transmitida, la fiebre

recurrente o espiroquetosis.

Limitándonos al cerdo, encontramos como parásitos habituales de la piel los siguientes:

Arachnoidien
 Sarcoptes Scabiei Caprae
 Sarcoptes Sabiei Suis
 Sarcoptes scabiei Parvula
 Ixodes Pilosus
 Ixodes Holocylus
 Rhipicephalus Haemaphysaloides
 Amblyoma Cayennense
 Amblyoma Americanum
 Amblyoma Hebraeum
 Amblyoma Splendidum
 Amblyoma Intergrum
 Haemophysalis Bispinosa
 Haemophysalis Hystrichis
 Haemophysalis Parmata
 Ornithodoros Erraticus
 Orhithodoros Túnica
 Orhithodoros Moubata.

El género *Ornithodoros* presenta una morfología general que sirve a su clasificación, ausencia de cordón limitando la zona ventral de la dorsal, ojos generalmente presentes, cuerpo relativamente grueso, afilado en la parte anterior y redondeado en la posterior. Las figuras VIII -3,4,5 ayudarán a identificarlo.

Las principales especies del género se encuentran resumidas en el Cuadro VIII -1 donde se puede observar que la mayoría de estas especies son agentes de transmisión de una enfermedad

La transmisión del P.P.A. ha sido demostrada sobre los *Ornithodoros erraticus* y *moubata*, que se han revelado aptos a permitir la multiplicación del virus.

Estos parásitos se comportan como agentes de transmisión tanto más peligrosos ya que transmiten la infección viral a su descendencia (difusión transovárica).

El *Ornithodoros Erraticus* ha sido señalado en los países del Norte de Africa (Argelia, Túnez, Marruecos y Senegal), y en el Sur de la Península Ibérica.

El *Ornithodoros Erraticus* es un artrópodo de actividad nocturna, que durante el día se cobija en las rendijas, agujeros, fisuras, etc., que le proporcionan la penumbra y humedad que desean. Son animales dotados de una gran resistencia a las condiciones alimenticias más desfavorables; la literatura relata un caso de supervivencia a un ayuno de cinco años.

Son parásitos hematófagos estrictos, se fijan al cerdo y aspiran su sangre hasta que el parásito se transforma en un verdadero recipiente de sangre, en ese momento se desprende y se esconden, entrando en una fase semiletárgica el tiempo que dura la digestión.

Su reproducción es ovípara, la hembra pone los huevos en las rendijas, fijándolos con una sustancia viscosa, que ella misma segrega. En oposición a los ixodides la hembra sobrevive a la puesta e incluso desarrolla una actividad normal.

Del huevo nace una larva hexápoda, que se alimenta sobre el cerdo, antes de proceder a una muda que la transforma en una ninfa octópoda. La ninfa se alimenta igualmente sobre el cerdo y a través de mudas sucesivas se convierte en adulto.

Su enemigo natural son las aves insectívoras. Su eliminación de la cochiguera es difícil si no se procede a un saneamiento o transformación de los locales. Los tratamientos a base de petróleo, aceite de pescado, cresil, esencia de trementina o productos comerciales de actividad similar, tienen un efecto parcial sobre el grado de infestación de los locales. El tratamiento será eficaz si ha sido precedido de un cambio de las condiciones higiénicas de la cochiguera.

En el Sur de España, el saneamiento debido a la transformación de las explotaciones extensivas por necesidades comerciales, ha reducido el área ecobiológica

del parásito hasta el punto de haberlo hecho prácticamente desaparecer.

En lo que se refiere a otros ectoparásitos estudiados: *Amblyoma Americanum* y *Cayennense* no albergan ni transmiten el virus.

Ornithodoros coriaceus puede albergar y transmitir el virus durante cuatro meses sin que la transmisión transovárica haya podido ser demostrada.

Un trabajo interesante en los países amenazados o recientemente invadidos, podía consistir en conocer de manera exacta los ectoparásitos del cerdo y su localización geográfica, lo que podría permitir futuros estudios epizootiológicos de gran interés en el momento de combatir la enfermedad o de planear racionalmente su eliminación. La idea lanzada hace años por un grupo de especialistas, se abre camino poco a poco y en el momento actual se trataría de coordinar y uniformar estos trabajos a nivel internacional.

Vectores Pasivos: Serían los animales no sensibles a la multiplicación viral, es decir, aquellos que a través de sus deyecciones, pelos, plumas, etc., accidentalmente contaminados pueden poner el virus en contacto con la boca o los alimentos del cerdo. Este es igualmente el caso de los humanos en general y sobre todo de aquellos que por su profesión pone en contacto con el cerdo; sus productos, ropa, calzado, vehículos, etc., pueden ser una fuente de virus muy importante en la difusión de la enfermedad.

Objetos Contaminados: El suelo, alimentos, utensilios y otros objetos inanimados, pueden ser una potencial fuente de virus sobre todo en el momento de repoblación.

Pocas informaciones se han publicado en lo que se refiere a la resientencia del virus en una cochiguera infectada. Las observaciones más serias la cifran entre 60 y 90 días en ausencia de una verdadera desinfección.

B. Resistencia del Virus:

Recordemos que según sus propiedades resisten al frío y al calor, a las variaciones de pH en el sentido acidez y alcalinidad. La sosa a diez por mil, y mejor aún adicionada de diez por ciento de cal viva es un excelente desinfectante, económico y de actividad fácil de controlar, por el simple uso de papel pH.

El formol a uno por mil, se emplea sobre todo, en pulverizaciones para la desinfección de vehículos locales.

C. Receptividad:

Esta es exclusiva para la especie porcina, la raza, edad y sexo, no modifican la receptividad, el estado de nutrición no tiene tampoco ninguna influencia, sin embargo señalaremos que parece que los animales cebados son más sensibles a las lesiones vasculares que la enfermedad produce, por lo que en general son los mejores ejemplares en morir en los casos de evolución aguda.

D. Vías de contagio:

El contagio natural se realiza por vía oral, A veces este contacto se efectúa por vía parenteral, en el caso de la infección producida por insectos hematófagos, como el chinchorro, o en el caso de la infección de un producto terapéutico o preventivo contaminado.

Experimentalmente, el contagio puede realizarse prácticamente por dos vías:

- E. Formas de contagio: Existen dos formas posibles;
- . Contagio directo : animal sano + animal enfermo o portador.
 - . Contagio indirecto : animal sano + vector animado o inanimado.

Contagio directo: Se realiza por contacto íntimo entre un cerdo sano y un excretor de virus (cerdo enfermo, portador inaparente o garrapata infectada).

Esta forma de contagio está facilitada por los intercambios comerciales de las explotaciones; como estos intercambios son cada vez más frecuentes y a mayor distancia, el mecanismo directo de contagio toma cada día mayor amplitud. Las ferias, mercados, exposiciones, etc., que reúnen una gran cantidad de cerdos de diversos orígenes, contribuyen a la diseminación viral por contagio directo. La explotación extensiva, por el mismo mecanismo de reunión de animales es otro factor de propagación.

Contagio indirecto: La vía natural de contagio -vía oral-, se realiza cuando se pone al alcance de la boca del cerdo uno de los agentes de transmisión animados o inanimados a que hemos hecho mención.

Colocaremos en primer lugar, por su importancia, los alimentos que son responsables de la mayoría de focos secundarios. Por otra parte, las técnicas de conservación de alimentos hacen que, la aparición de focos debidos a estas conservas sean imprevisibles en el tiempo.

Los vehículos de transporte son un agente indirecto de diseminación de gran importancia. Las necesidades comerciales han hecho necesario en ciertas regiones la creación de una verdadera industria de recogida de cerdos, por el sistema de puerta a puerta, la mayoría de las veces son vehículos no adecuados a este tipo de transporte. Un camión que recoge cada día cierto número de cerdos, en media docena de granajas diferentes y recorriendo un trayecto de varios kilómetros, en los que reparte generosamente orina y heces, es un agente diseminador de primer orden. Un camión que reparte sacos de pienso en las mismas condiciones, es igualmente peligroso aunque en menor grado, debido a la ausencia de producción de virus. Los vehículos del veterinario, lechero, comprador de fruta o de huevos, etc., son otros tantos factores de diseminación. Los vehículos de transporte internacional, sobre todo terrestre, pueden actuar como diseminador en regiones fronterizas.-

Igualmente pueden ser agentes de diseminación los embalajes de los objetos más diversos, que pueden haber tenido un contacto, en su cara externa o interna con el virus.

Los laboratorios autorizados a manipular el virus de la P.P.A., así como su personal y material, pueden ser responsables de la aparición de focos a través de un mecanismo de contagio indirecto. Así como los productos farmacéuticos o biológicos en cuya composición entren órganos o tejidos de cerdo.

El hombre y los animales no sensibles pueden ser igualmente responsables de contagio indirecto, por transporte mecánico del virus vehiculado exteriormente (zapatos, ropa, pelo o pluma), o en sus deyecciones, pues el virus atravesaría el tubo digestivo sin gran pérdida de su poder patógeno.

En el momento de la repoblación de una granja infectada, los utensilios y el material de la explotación, pueden dar origen a un nuevo foco.

2. Epizootiología de la P.P.A.

Con anterioridad a 1909, el virus de la P.P.A. estaba exclusivamente albergado por los cerdos salvajes africanos, y en especial por el Phacochoero. La relación virus-animal, no tenía como consecuencia la muerte de este, y la multiplicación viral se producía en ausencia de síntomas, (salvo una fiebre ligera y pasajera descrita por algunos autores). En estos momentos el virus de la P.P.A. podría estar considerado como un germen saprófito del Phacochoero.

Este equilibrio virus-Phacochoero, pudiera haber durado mucho tiempo en el continente africano, sin que la existencia del virus representara una enfermedad. Para que una enfermedad exista hace falta un revelador, es decir un animal sensible en el que el virus manifieste su poder patógeno. En el caso de la P.P.A., este revelador fueron los cerdos domésticos, introducidos por los colonos

en Kenya, en el año 1909. La revelación fue brutal, sobre 90 cerdos introducidos, 90 enfermaron y murieron. A partir de este momento, en que el virus manifestaba su poder patógeno, la enfermedad existió.

Las importaciones de animales domésticos continuaron y con fortuna diversa los cerdos de origen europeo convivieron con el Pacohero (considerado como reservorio de virus y portador sano, títulos que conserva hasta nuestros días) focos de la enfermedad se manifestaron por todo el territorio ocupado por los suidos salvajes, pero medidas elementales de aislamiento para separar los cerdos domésticos y salvajes, así como una relativamente escasa concentración de cerdos domésticos en el continente africano, hicieron que la enfermedad no se manifestara en grandes ondas epizooticas.

Después de una seria alerta en Portugal, en 1957, el virus salió de Africa en 1960, contaminando la Península Ibérica. Por segunda vez los restos de comida de un avión procedente de Angola, desembarcan en el aeropuerto de Lisboa, y dan origen a una serie de focos en los suburbios de la capital, posteriormente estos focos se extienden a todo el país.

La frontera entre España y Portugal, en su zona sur, presenta una gran cantidad de focos en regiones en las que existe la cría extensiva de cerdos. Los cerdos en libertad se alimentan de las bellotas de la encina, con la sola vigilancia de un porquero, que tiene a su cargo los animales de diferentes propietarios. La enfermedad encuentra, con este sistema de cría, una gran facilidad para transmitirse. En estos momentos, el principal modo de transmisión es de cerdo a cerdo y la enfermedad evoluciona con un curso agudo; lesiones hemorrágicas intensas, morbilidad y mortalidad elevadas.

En España, la inmovilización de los animales y las medidas elementales higienico-sanitarias hicieron que la cantidad de nuevos focos disminuyera, hasta el punto de hacernos creer que se había conseguido eliminar la enfermedad.

Un importante foco secundario en los suburbios de Madrid, debido probablemente, a un contagio a través de los restos de alimentos, nos hizo perder rápidamente esta esperanza. Los suburbios de Barcelona y de otras grandes capitales de provincia, marcaron el principio de la invasión total del país. Este mecanismo -restos de comida / aeropuerto / cerdo alimentado con restos de comida en los suburbios de la gran capital-, se repite con frecuencia tal, que nos hace pensar que es el modo de contagio más importante en lo que se refiere a la puerta de entrada de la enfermedad en un país, y a su ulterior difusión (Cuba, Brasil, Malta, Cerdeña y Santo Domingo, pueden servirnos como ejemplos recientes).

En el caso de Francia es diferente, pues la puerta de entrada tiene como origen probable, los restos de alimentación ocasionados por los movimientos de población (turismo o inmigración). La localización del primer foco ha sido en todos los casos, a proximidad de la frontera española.

Tres factores principales, han contribuido a impedir la invasión del resto de Francia, a partir de estos focos primarios:

- . La rápida intervención de las autoridades sanitarias y un diagnóstico precoz que impidió la llegada del virus a las grandes capitales.
- . La estructura económica del país, hace que los suburbios de las grandes capitales, tengan carácter eminentemente industrial.
- . La casi totalidad de las explotaciones porcinas, emplean los piensos compuestos para la alimentación de los animales.

De modo general, en los focos primarios de los suburbios, la enfermedad se extiende rápidamente a favor de unas condiciones higiénicas frecuentemente deplorables y de una ausencia casi total de control veterinario. A partir de estos focos de suburbios, la enfermedad gana el resto del país a través de los restos de alimentación y más raramente por intercambios comerciales.

En este punto todos los mecanismos de contagio entran en juego y la marcha de la epizootía tiende a escapar al control. La enfermedad deja de propagarse en sentido centrífugo como una mancha de aceite, para aparecer de forma imprevisible en el espacio y en el tiempo.

La presentación por primera vez en un país y su ulterior difusión se realiza de acuerdo con los caracteres biológicos de la cepa de P.P.A. objeto del ataque.

Este concepto merece una explicación; cuando se habla de cepas de alta o baja virulencia no queremos decir que la cepa esté compuesta exclusivamente de virus con una u otra característica. Hay que comprender que la cepa de "campo" responsable de un foco, está compuesta de una serie de partículas víricas de caracteres heterogéneos y que la calificación corresponde a la dominante de manifestación, lo que no excluye la posibilidad de que el otro carácter haga su aparición, dando origen a enfermos o a focos de evolución diferente.

A nivel del laboratorio, las cepas de "campo" son objeto de manipulaciones (clonajes), que tienden a aislar un solo virion a partir del cual se obtendrá una cepa homogénea, que responderá siempre de la misma manera. La obtención de estas cepas clonadas es muy difícil en el caso de la P.P.A. y su estabilidad muy dudosa por lo que es raro conservarlas con un carácter homogéneo.

De manera general, la evolución de la P.P.A. en 1978 es aguda en los países recientemente infectados, Brasil hace excepción por una convivencia casi igualada, de focos a evolución rápida y de focos de evolución lenta, lo que hace singularmente difícil su clasificación. En España y en Portugal, una nueva tendencia a la presentación de focos a evolución rápida parece desplazar la precedente de focos a evolución lenta.

La prueba de la evolución constante de las manifestaciones clínicas de la

de la P.P.A., es que durante el período transcurrido entre la redacción y la impresión de estas líneas, la tendencia de la mortalidad está en neta regresión. Así de forma general, y en la medida que los sacrificios sanitarios lo permitieron, se pudo constatar en Cuba y Santo Domingo, que la mortalidad de aproximadamente 80% al iniciarse la invasión, bajó a 10 - 20% en el momento de la eliminación de los animales. Haití constata igualmente una disminución de este parámetro que se sospecha, actualmente reducido a un 5%.

IV. LESIONES

Las lesiones se dividen en:

1. Macroscópicas, o lesiones anatomopatológicas
2. Microscópicas, o lesiones histopatológicas

1. Lesiones Anatomopatológicas

La imagen general es, como en el caso de la P.P.C., la de una septicemia hemorrágica.

Así la lesión dominante es un cuadro de fuerte congestión, con presencia de hemorragia, abundantes líquidos serosos, ganglios con fuerte congestión o hemorrágicos, bazo friable e hipertrófico.

Un esquema rápido de las lesiones presentes en los casos de P.P.A. aguda sería:

Lesiones Externas

Manchas rojas que oscilan entre el color rosado del exantema al violáceo de la cianosis, posible presencia de hemorragias que van de la petequia a la subfusión, todas ellas localizadas de manera preferencial a nivel de las orejas, vientre y cara interna del muslo.

Lesiones internas

- Tejido conjuntivo : posible presencia de un color icterico.
- Músculos : aspecto febril.
- Serosas : presencia de congestión y/o hemorragias, sobre todo pericardio y peritoneo. Las cavidades serosas presentan abundantes exudados fibrinosos, más o menos hemorrágicos.
- Cabeza : nariz y senos congestión hemorrágica.
- Laringe : petequias y edema
- Meninges : congestión
- Tórax : pulmón, edema gelatinoso o hemorrágico.
corazón, hemorragias en miocardio, y en la pared interna del ventrículo izquierdo.
- Abdómen : estómago, gastritis hemorrágica.
ciego, edema hemorrágico
recto, congestión, hemorragias que presentan la forma de hematomas en relieve.
hígado, a veces congestión y con zonas de degeneración.
Vesícula biliar, edema gelatinoso en la pared, vasos muy marcados.
Riñón, hemorragias de forma petequeal, que a veces, pueden llegar al hematoma subcapsular completo.
Vejiga, edema y petequias.
Bazo, esplenomegalia hemorrágica, hipertrofia, consistencia friable, posibles infartos
Ganglios, sobre todo a nivel de gastro-hepáticos, hipertrofia, congestión hemorrágica, que a veces es tan intensa que el ganglio toma el aspecto de una mora.

Este cuadro se puede encontrar completo en un mismo animal, pero generalmente se obtiene por la adición de lesiones encontradas durante la autopsia de diferentes animales.

Según la patogenicidad del virus, las lesiones son más o menos intensas, e incluso inexistentes en uno o varios órganos, o en el animal completo.

La enfermedad presenta un cuadro análogo al de la P.P.C., lo que incitó al Profesor Sánchez Botija, C., del Laboratorio de Madrid, a establecer una relación lesional entre las dos enfermedades. Así en función de los órganos más frecuentemente alterados (bazo, ganglios, riñon y corazón), se establece el cuadro siguiente:

LESIONES		
Tipo I	Tipo II	Tipo III
Más frecuentes en P.P.A.	Más frecuentes en P.P.C.	No significativas

La lesión de tipo I, más frecuente en P.P.A., es una lesión cuya intensidad no se observa frecuentemente en la P.P.C.

- Bazo : Esplenomegalia, fuerte congestión o hemorragias color obscuro y pulpa friable.
- Ganglios : (gátricos, renales e ilíacos), fuertes hemorragias, consistencia blanda, color obscuro.
- Riñon : Petequias en gran cantidad y de gran tamaño. Hemorragia capsular.

Corazón : Extensas hemorragias en epicardio y miocardio.

La lesión de tipo II, más frecuente en P.O.C., es la que se encuentra corrientemente en esta enfermedad.

Bazo : Normal o con una esplenomegalia discreta; ligera congestión; presencia de infartos en el borde.

Ganglios : Rojos a nivel de la cápsula, al corte aspecto de mármol estriado en rojo y gris.

Riñón : Petequias finas en el surco coronario.

La lesión de tipo III, consiste en una imagen de congestión discreta o ausencia de toda lesión sobre los órganos indicados.

En el caso de evolución crónica es frecuente encontrar lesiones de tipo degenerativo, pero la más constante e importante es una neumonía que va desde intersticial a caseosa.

Esta rápida visión de la Anatomía Patológica, debe servirnos para comprender que en un gran número de casos el diagnóstico será difícil en razón de la variabilidad de la intensidad y de la presencia de las lesiones, y que en el mejor de los casos solamente podremos emitir un diagnóstico de sospecha o de orientación, pero jamás definitivo, en cuanto al agente etiológico se refiere.

2. Lesiones histopatológicas

Las principales lesiones microscópicas se localizan sobre el Sistema Retículo-Endotelial. Las más precoces e intensas son visibles a nivel del bazo, ganglio y médula ósea.

La lesión fundamental es cualitativamente la misma, pero su manifestación cuantitativa difiere según los órganos; así el timo presenta una resistencia a los fenómenos degenerativos que la multiplicación del virus provoca.

Tres criterios nos van a servir para el estudio esquemático de esta lesión principal:

Contaje de células circulantes, células reticulares y células endoteliales.

Sobre estas células y como consecuencia de la acción viral provocada por la inoculación experimental, se pueden observar dos tipos de fenómenos:

Proliferativos:

que alcanzan su máximo hacia el cuarto día de post-inoculación (pi)

Degenerativos :

que se hacen más manifiestos y profundos a partir del quinto día pi., cuando los fenómenos proliferativos regresan.

Durante la fase proliferativa, la cantidad de linfocitos aumenta (este aumento celular se realiza principalmente a partir de las transformaciones de los linfocitos T, como respuesta al estímulo del antígeno viral), y las células del retículo presentan una actividad mitótica superior a la normal.

A partir del quinto día de pi, las lesiones celulares de tipo degenerativo se hacen manifiestas y profundas.

Así sobre el endotelio de los vasos, la degeneración produce una alteración de su fisiologismo, que se traduce por importantes cambios de la permeabilidad, con su cortejo de exudación. Por otra parte, masas ricas en fibrina y en restos celulares, se presentan en el interior de los vasos, y llegan a obturar la luz de los capilares, con los fenómenos de trombosis consecutivos. Esta lesión acaba en una diapedesis masiva de hematies, que da el aspecto hemorrágico a los órganos.

Las células reticulares están igualmente afectadas por los fenómenos degenerativos, hasta el punto de que a veces, son prácticamente inexistentes y su plaza esta ocupada por las hemorragias precipitadas.

El conteo celular, arroja cifras normales o ligeramente inferiores de los linfocitos, pero estas cifras descienden en el momento de la presentación de picos térmicos. Los neutrofilos marcan un ligero aumento relativo. Los eosinofilos, basofilos, monocitos y hematies no presentan cambios significativos .

De forma esquemática sobre los principales órganos, podemos resumir estas lesiones de la forma siguiente:

Bazo, ganglio, médula ósea : Alteración de la pared de los vasos. Hemorragias en las cavidades precedidas por destrucción de la trama reticular. Cartorrexis y picnosis de las células linfoides.

Además de la alteración de los vasos señalaremos en :

Pulmón : Los alveolos y las travéculas interalveolares, aparecen repletos y dilatados por la presencia de una serosidad rica en células de descamación y en hematies, La pared alveolar se presenta atrofiada o hipertrofiada por proliferación de las células de revestimiento e infiltración de mononucleares, presentando ectasis capilar.

Riñón : Lesiones más acusadas en la zona cortical. En el glomerulo de Malpighio se detecta un espesamiento de las hojas visceral y parietal de la cápsula de Bowman. En los tubulis renales fenómenos de tipo tóxico-necróticos.

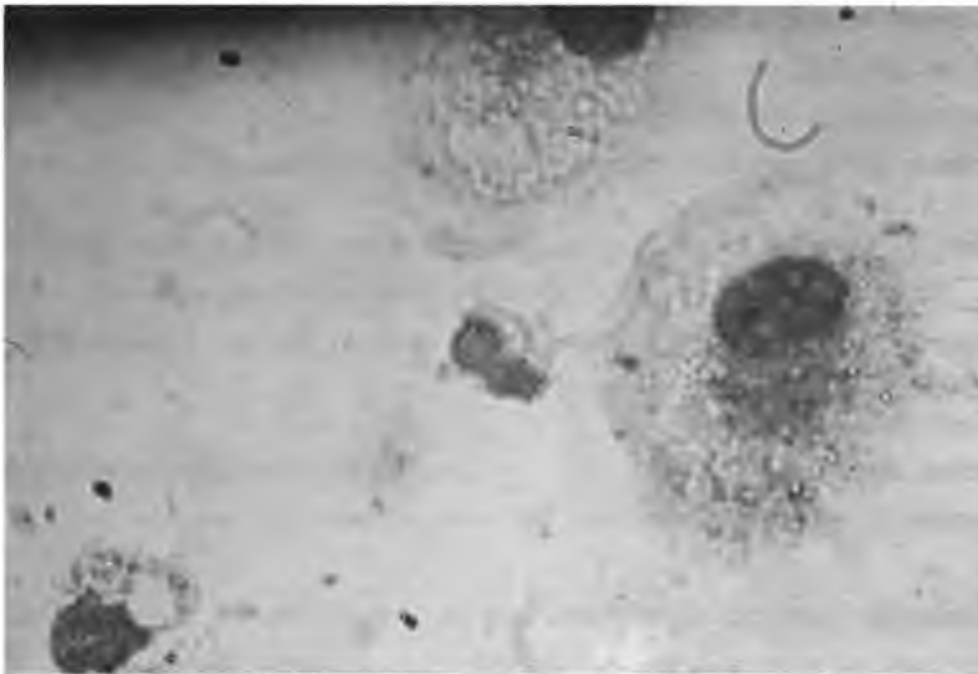
Sistema nervioso central : Lesión de tipo degenerativo en las substancias gris y blanca del cerebro, cerebelo y médula espinal.

Una vez más podemos constatar, que la lesión microscópica no aporta elementos decisivos para establecer un diagnóstico diferencial entre la P.P.C. y la P.P.A.

CUERPO DE INCLUSION

Primera fase de formación, aparición de una zona metacromática en el citoplasma

Coloración de Giensa

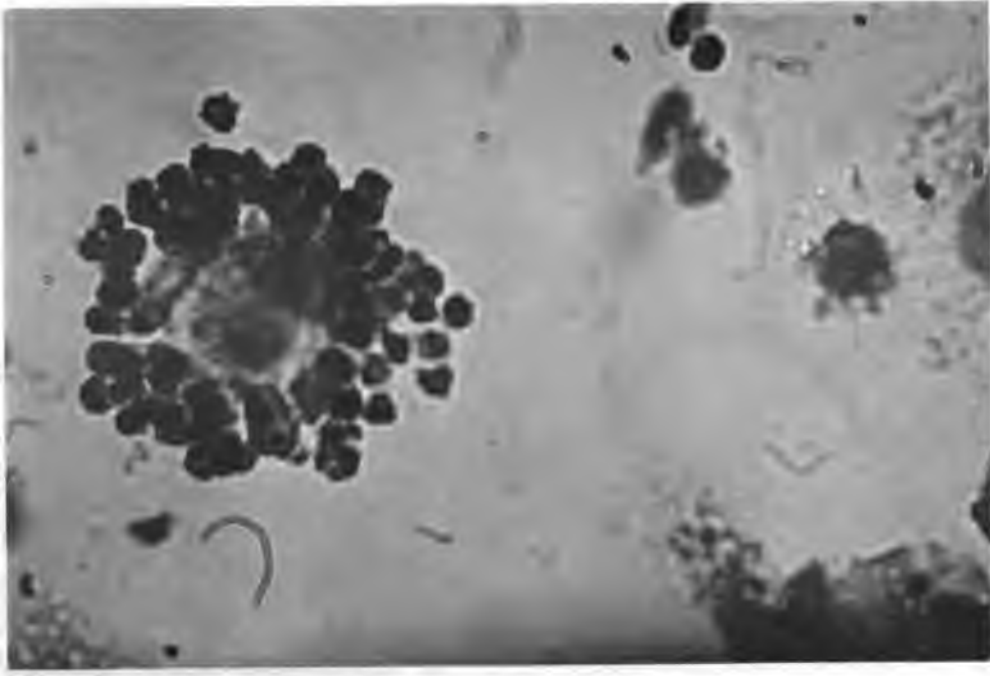


Segunda fase de formación
Presencia de la inclusión organizada
Coloración Giensa



Efecto citopático consecutivo a la multiplicación viral

- . Núcleo con marginación de la cromatina.
- . Inclusión citoplasmática
- . Hemoadsorción.



V. PATOGENIA

No está suficientemente aclarada.

Parece seguro que la vía más frecuente de contagio natural es la vía oral. El virus penetraría en el organismo a nivel de las amígdalas, donde realizaría una primera multiplicación asintomática, desde este punto se difundiría en el organismo por la vía linfo-hematógena, que la conduciría a los tejidos de elección, es decir al sistema retículo-endotelial.

En los casos de evolución aguda, se piensa que las manifestaciones de la enfermedad, son debidas a las alteraciones graves del sistema circulatorio siendo los fenómenos degenerativos de los endotelios los responsables de síntomas y lesiones. Dos teorías se oponen para explicar la genesis de estas lesiones: La primera propone la acción directa del virus, la segunda, la formación de complejos antígeno-anticuerpos, de efecto citotóxico.

Las alteraciones más o menos profundas del sistema circulatorio ocasionarían los fenómenos de isquemia, además congestiones y hemorragias, que caracterizan esta enfermedad; por otra parte, los fenómenos de destrucción del retículo contribuyen a alterar profundamente el metabolismo general del animal, cuya muerte sobreviene cuando estas lesiones son incompatibles con el fisiologismo normal de un órgano vital.

En los casos de evolución sobre-aguda, la muerte brusca del animal tiene, generalmente, por origen una lesión cardíaca aguda.

En los casos de evolución crónica, una neumonía caseosa, y las alteraciones del sistema nervioso central, manifestadas por parexias y paraplejias, son la causa de la ruina fisiológica del animal, ya que le conducirá a la muerte.

VI SINTOMAS

La enfermedad cursa, como la P.P.C., con un carácter septicémico.

Según la patogenicidad de la cepa viral, la evolución puede adoptar las formas:

Sobre-aguda

Aguda

Aguda atípica

Crónica

Sub-clínica.

La mayoría de las descripciones de las formas evolutivas, han sido descritas por los Laboratorios Nacionales de España y Portugal, puesto que en la Península Ibérica donde se ha podido observar las variaciones de la patogenicidad durante un cierto período de tiempo, y en consecuencia realizar un estudio comparativo de las diferentes formas de presentación.

De manera general, una septicemia cursa en cuatro fases:

1. Asintomática, que corresponde al período de incubación.
2. Febril
3. Sintomática
4. Final, generalmente coma hipotérmico que precede la muerte del animal.

Tomando como modelo, la presentación más frecuente, es decir, la evolución aguda, podremos esquematizar los síntomas de la manera siguiente:

- a. El período de incubación varía entre 5 y 9 días
- b. La fase febril asintomática dura de 1 a 3 días con una fiebre de 41 a 42°C.
- c. La fase sintomática se caracteriza por la aparición de las manifestaciones clínicas de la enfermedad: Cianosis de la piel (sobre todo a nivel de las orejas, vientre y cara interna del muslo); conjuntivitis sero-hemorrágica, rinitis con mucosidades

sero-hemorrágicas, a veces epistaxis, anorexia, disnea a veces acompañada de tos, estreñimientos o diarreas a veces hemorrágicas. Abortos de las hembras gestantes, manifestaciones nerviosas tales como decúbitos anormales, marcha vacilante provocada por parálisis más o menos intensa del tercio posterior.

- d. La fase fina se presenta de 2 a 7 días después de la aparición de los síntomas, la temperatura desciende a 36.5°C, y el animal muere en estado comatoso con parálisis total.

En la evolución sobre-aguda, la incubación es de 2 a 4 días y va seguida de la muerte brusca del animal en ausencia de síntomas.

En la evolución aguda-típica, la incubación es como en los casos agudos de 5 a 9 días. Solamente enferman unos cuantos animales que manifiestan una sintomatología muy discreta. El contagio parece detenerse de manera espontánea, incluso en los rocos en los que los cerdos conviven en estrecho contacto. En estas condiciones, la enfermedad manifiesta su presencia sobre todo en los lechones, que tampoco presentan una sintomatología expresiva. Los casos de abortos son igualmente frecuentes en este tipo de evolución.

Las formas crónicas, cursan con manifestaciones clínicas discretas pero presentes.

Los enfermos crónicos, pueden tener dos orígenes:

Supervivientes de las formas agudas y verdaderos enfermos crónicos desde el comienzo de la enfermedad.

Los síntomas más frecuentes encontrados son: anorexia, tos, adelgazamiento, artritis, úlceras cutáneas.

La mayoría de estos enfermos mueren después de 30 a 90 días de enfermedad una minoría sobrevive más tiempo, con síntomas severos de neumonía y pericarditis.

Las formas subclínicas suelen presentarse en asociación con las evoluciones crónicas. Es la forma más insidiosa de presentación de la enfermedad. Sobre una población de cerdos, aparentemente sanos (aunque a veces pueden presentar un ligero retraso de crecimiento), de vez en cuando un individuo presenta manifestaciones respiratorias, tos y disnea. Los signos respiratorios se agravan progresivamente y el animal muere.

VII. DIAGNOSTICO

El diagnóstico está basado en el conjunto de datos epizootiológicos, sintomáticos, necropsicos y de laboratorio.

De lo expuesto anteriormente, podemos deducir que las informaciones suministradas por la observación del enfermo, o que pueden revelar las autopsias de los cadáveres, no son suficientes para establecer un diagnóstico de P.P.A. En los casos más evidentes, podremos formular un diagnóstico de peste porcina, pero en ningún caso podremos llegar a identificar al virus responsable.

Las informaciones recogidas del contexto epidemiológico, son de gran interés. La circulación de una buena información, sobre la localización de focos, puede crear una casi certeza de diagnóstico, en los países afectados. El caso de los países no afectados o en los que la información circula mal, es diferente, pues no es frecuente que el veterinario ante un primer caso, piense en la P.P.A., su primer pensamiento es para la P.P.C., lo que es normal dada la distribución casi universal de esta enfermedad.

En este estado de espíritu, parece necesario recordar, que el virus P.P.C., no presenta diferencias inmunológicas. Durante algún tiempo, una cierta confusión ha reinado sobre este punto, que ya hemos definido en el capítulo Propiedades Biológicas-Poder Antígeno del Virus.

El virus P.P.C., puede presentar a nivel de las técnicas empleadas en el laboratorio, ciertas diferencias serológicas que permiten clasificar las cepas en normales, cepas tipo 331, etc., pero estas diferencias no existen a nivel de la respuesta inmunológica. Así un animal correctamente vacunado, con cualquier tipo de vacuna, contra la P.P.C. se muestra correctamente protegido contra todas las variantes serológicas conocidas del virus P.P.C.

Por lo tanto, si la encuesta epizootológica revela que animales correctamente vacunados contra la P.P.C., presentan síntomas y lesiones de peste, debemos pensar y actuar como si se tratara de la P.P.A., pues toda pérdida de tiempo es peligrosa y no justificada. Mas tarde el laboratorio aclarará si se trata de un fallo de la vacunación P.P.C. (debido a la vacuna o a los animales), o si se trata, como es más probable de un caso P.P.A.

En todos los casos el diagnóstico diferencial P.P.A. / P.P.C. solamente podrá establecerse en el Laboratorio. Y para que éste pueda emitir un diagnóstico correcto, es necesario una estrecha colaboración entre el veterinario clínico, que está en contacto con los animales, y el veterinario del laboratorio, que va a aplicar las diferentes técnicas de diagnóstico. El veterinario clínico debe conocer las técnicas que van a utilizarse, con el objeto de saber lo que puede esperar de ellas; seguridad, tiempo de respuesta para los casos positivos o negativos, etc.

El veterinario de laboratorio debe esperar, que las muestras le lleguen en cantidad suficiente y en un estado de conservación compatible con las técnicas a utilizar. Debe esperar igualmente que las muestras estén asépticamente recogidas, y que vengan acompañadas de la información necesaria para saber qué técnica emplear, y como interpretar los resultados.

Esta colaboración es necesaria, pues no se trata de jugar a las adivinanzas, ni por parte de unos ni de otros, sino de identificar y eliminar una

enfermedad, que puede arruinar la producción porcina y con ella, -no lo olvidemos-, una de las principales fuentes de ingreso de la clase veterinaria.

1. Muestras

Qué muestras enviar? Bazo, ganglios hepato-gástricos, ilíacos y renales, riñón, amígdalas, sangre heparinada, sangre normal.

De qué animales se recogerán? Organos de animales recién muertos, o que sacrificaremos en la fase febril o agónica de la enfermedad. La sangre heparinada de animales febriles, (la heparina no debe llevar agentes de conservación que suelen ser tóxicos para los cultivos, no emplear como anticoagulante ni los citratos, ni los oxalatos, que tienen una acción virulicida), la sangre normal de enfermos crónicos o animales convelescentes.

De qué cantidad de animales conviene tomar muestras? De tres o cinco animales en las pequeñas explotaciones, y del orden de diez a veinte, en las grandes.

Esto no quiere decir que haya que enviar forzosamente veinte bazos diferentes. Se enviarán tantos bazos como animales hayan muerto recientemente o se sacrifiquen, el resto se completará con sangre heparinada de animales febriles y suero de convelescentes, si existen.

Estas muestras deben ir acompañadas de protocolos completos, pues es necesario conocer la evolución de la enfermedad, el origen de los últimos cerdos introducidos, vacunaciones y fechas, aspecto del animal sobre el que se tomó la muestra, etc.

Los protocolos servirán para determinar las técnicas que se van a emplear, pues un laboratorio en plena onda epizootica, no empleará todas las técnicas, sobre todas las muestras, ya que sería una pérdida de tiempo y de material que

podría ser empleado para otros casos.

Una vez las muestras recogidas en las mejores condiciones asépticas posibles, se procederá a su envío al laboratorio.

Tres condiciones deben ser respetadas:

- a. Los paquetes deben estar herméticamente cerrados y estériles en su parte exterior, de modo que el envío de las muestras, no sea una fuente suplementaria de diseminación del virus.
- b. Viajarán rápidamente. Un viaje de 24 - 48 horas nos dará muestras en perfectas condiciones para poder aplicar todas las técnicas del diagnóstico.
- c. Viajarán con la protección del frío. Temperatura de 0-8°C. La congelación no es indispensable.

La mayoría de estas condiciones se reúnen con el empleo de cajas isotermas de polietileno prensado, a la que se añaden bolsas de plástico conteniendo agua helada, así las muestras pueden viajar sin alteraciones notables 24 a 48 horas.

2. Diagnóstico Experimental

Tradicionalmente se divide en dos tipos:

- a. Diagnóstico por aislamiento e identificación del virus.
- b. Diagnóstico por identificación de anticuerpos.

A su llegada al laboratorio, las muestras deben ser rápidamente identificadas a fin de evitar confusiones, sobre todo si los envíos son abundantes.

Una vez que se identifican, se procederá a la observación macroscópica de los órganos, para comprobar la presencia, o ausencia de lesiones. Una parte del órgano será separada para la confección de inóculos; otra parte será congelada

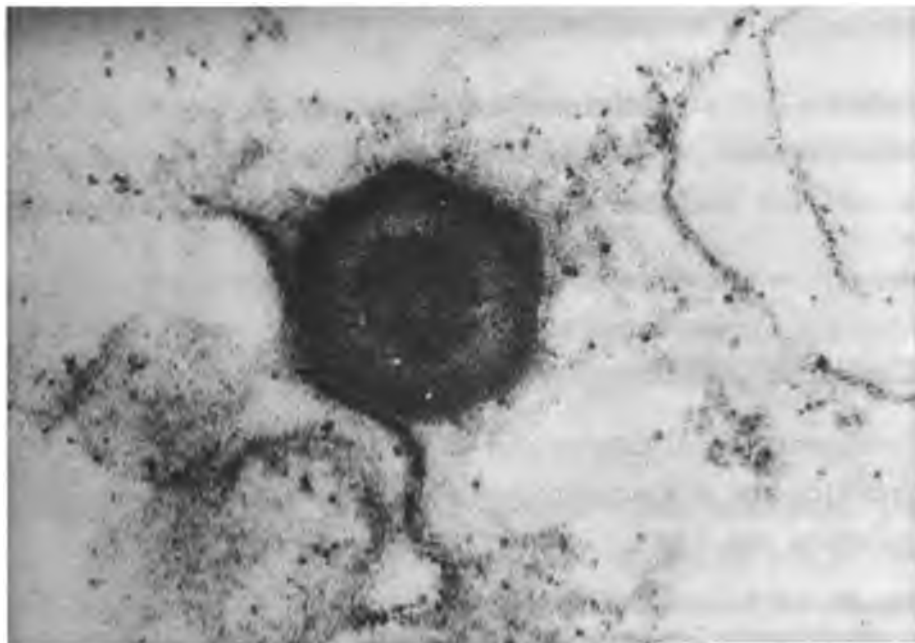
a 20°C para poder disponer de material en caso de repetición de análisis.

El resto será destruído, con todas las precauciones debidas a un material ciertamente contaminado.

La parte dedicada a la preparación de inóculos se tratará, como se indica en el anexo, de forma a obtener una suspensión final del órgano a 20 por ciento, de sangre a 10 por ciento y de suero puro.

a. Diagnóstico Experimental por Identificación Viral

Se trata de evidenciar los caracteres principales del virus de la P.P.A., que puedan permitirnos su identificación.



Virus de la Peste Porcina Africana

El corte en microscopía electrónica se presenta en forma exagonal como corresponde a una estructura icosaedral.

La manera más simple y segura de identificar un virus, es la reproducción experimental de la enfermedad. Como la enfermedad no se reproduce en ningún animal del laboratorio, es necesario emplear el propio cerdo, y como en el caso de la enfermedad natural, el cerdo va a responder a la inoculación con manifestaciones de peste porcina, pero, sin indicaciones de su etiología. Por lo que para lograr la identificación, haremos uso de una de las propiedades del virus que vimos en el capítulo "Propiedades biológicas, Poder Antígeno". Esta propiedad es la ausencia de inmunidad cruzada con el virus de la P.P.C.

Un cerdo inmunizado contra la P.P.C., está protegido contra la acción patógena del virus P.P.C., pero es completamente sensible a la de la P.P.A. Si sobre este animal logramos reproducir experimentalmente la peste, tendremos la seguridad de que se trata del virus de la P.P.A.

Un suplemento de seguridad, está representado por la inoculación al mismo tiempo de un segundo cerdo sensible a la P.P.C. Cerdo que en los dos casos debe reproducir la enfermedad, así un esquema simple de diagnóstico por reproducción experimental de la enfermedad, basado en la prueba de inmunidad cruzada sería el siguiente:

MATERIAL PROBLEMA	Cerdo sensible a la P.P.C.	Cerdo resistente a la P.P.C.	Diagnóstico
	Reproducción de la enfermedad	No reproducción de la enfermedad	P.P.C.
	Reproducción de la enfermedad	Reproducción de la enfermedad	P.P.A.
	No reproducción de la enfermedad	No reproducción de la enfermedad	Otra Etiología

Los detalles prácticos de la realización se encuentran en el anexo.

La técnica presenta como inconvenientes:

- . Los períodos de observación, que pueden ser largos.
- . El precio de los animales y su inmunización
- . La dificultad de tener cochiqueras de aislamiento en cantidad suficiente para hacer frente a un diagnóstico de rutina.

Pero presenta como ventajas:

- . Su seguridad
- . Puede ser realizada por un laboratorio no especialmente equipado en virología.

Por otra parte, los cerdos enfermos o muertos, como consecuencia de la inoculación experimental, han servido de multiplicador del virus, lo que nos proporciona un material de exámen en perfecto estado de conservación y rico en virus, lo que nos permitirá aplicar las técnicas más exigentes.

Este diagnóstico es imprescindible para la detección del primer (os) foco (os), en un país no experimentado con el diagnóstico "in vitro".

Estas consideraciones incitan a aconsejar a todos los países amenazados, en posesión o no de una buena estructura para el estudio de la virología, a mantener y cuidar en permanencia un lote de unos veinte cerdos hiperinmunizados u otro lote ligeramente superior de cerdos ciertamente sensibles al virus de la P.P.C. Los responsables sanitarios de cada país juzgarán, por ellos mismos, de las ventajas que representa este embrión de diagnóstico.

Es indudable, que si solamente se cuenta con este sistema de diagnóstico para combatir la enfermedad, las posibilidades se verían rápidamente desbordadas, por lo que es necesario preveer la continuación de este diagnóstico, si por desgracia su positividad dejara entrever una continuación.

Entre los diferentes métodos propuestos por los laboratorios especializados, se encuentran con más frecuencia:

- Precipitación en Agar
- Difusión radial
- Fijación del complemento
- Inmunofluorescencia sobre los órganos
- Hemadsorción sobre el cultivo de leucocitos

De todos ellos, el que ha sido frecuentemente empleado por más países y con el mejor resultado es la Hemadsorción sobre cultivo de leucocitos o test de Malmquist y Hay, pues corresponde a estos dos científicos estadounidenses el honor de haberla señalado por primera vez.

La técnica presenta como ventajas: Sensibilidad, rapidez relativa, especificidad, reproductibilidad y la experiencia adquirida, en casi veinte años de lucha ininterrumpida contra la P.P.A.

Tiene como principal inconveniente, el carecer de laboratorios provistos del dispositivo necesario para el cultivo de tejidos., aunque en el caso del cultivo de leucocitos este dispositivo este reducido a su mínima expresión.

Fue empleada en Francia, Italia y Cuba. Es empleada igualmente en España y Portugal, pero desgraciadamente en estos países el diagnóstico por Had, fue conocido un año después de la aparición de los primeros focos

Brasil, Santo Domingo y Cerdeña la emplean igualmente para hacer frente a la epizootia, que sufren en estos momentos.

Tiene su base científica en las propiedades fundamentales del virus, que se señalaron en el capítulo "Poder patógeno experimental".

Su especificidad se basa en el hecho de que ninguno de los otros virus porcinos produce la formación de hemadsorción, en el cultivo leucocitario.

¿En qué consiste este cultivo ?

Para los detalles técnicos ver anexo.

El cultivo consiste en aislar de la sangre o de la médula ósea del cerdo, los leucocitos que serán cultivados en presencia de suero de cerdo, hasta que su transformación morfológica nos indique que los macrófagos así obtenidos, son plenamente aptos para recibir el virus.

El cultivo de leucocitos no es, en el sentido clásico del término, un verdadero cultivo celular, puesto que por cultivo entendemos la multiplicación in vitro de las células, que se traduce en la formación de un tapiz de células en los cultivos estacionarios.

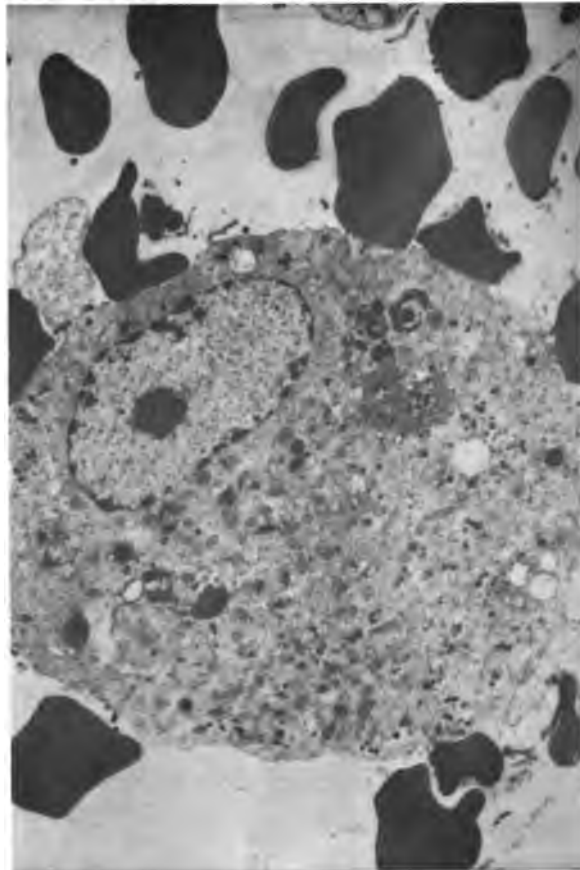
En el caso del cultivo de leucocitos se trata de una supervivencia de las células seguida de una transformación de un cierto número de entre ellas, sin que la multiplicación mitótica sea observada en los cultivos. Así a la observación al microscopio el cultivo de leucocitos no se presenta como un tapiz continuo, sino como una serie de células individualizadas, perfectamente aisladas unas de otras, lo que sorprende la primera vez a los habituados a la observación del tapiz celular clásico.

¿Qué células se cultivan ?

El cultivo se realiza a partir de los leucocitos mononucleados. Los leucocitos polinucleares degeneran y se separan del cultivo en las primeras 48 horas, los linfocitos y monocitos, superan esta fase y se transforman en células con una cierta semejanza morfológica, a las células blásticas de las que se tomaron origen, células que faltas de otro nombre mejor, llamaremos macrófagos.

La transformación se realiza gradualmente, en los 3-4 primeros días de cultivo, y morfológicamente consiste en un aumento del tamaño total de la célula, aumento que se debe principalmente al citoplasma. Así el linfocito, que habitualmente tiene un tamaño de 10 micras y un citoplasma apenas visible, se transforma en una célula de 30-50 micras de diámetro, sin un gran aumento del núcleo.

CELULA INFECTADA



La flexibilidad de la membrana del citoplasma hace que el cultivo sea muy polimorfo, las células adoptan formas variadas entre redondeadas y fusiformes.

Las células transformadas poseen un alto poder fagocitario, y en general no tienen tendencia de reunirse entre ellas, salvo si un cuerpo extraño está presente de modo accidental en el cultivo, por ejemplo una brizna de algodón, lo que hace que los macrófagos se vollicen hasta recubrirla en su totalidad.

Las células con dos o más núcleos aumentan a medida que pasa el tiempo de cultivo, por lo que son frecuentes al 5-6 días de cultivo, células que presentan 8 núcleos y más y que reciben el nombre de células polinucleadas gigantes. Con una frecuencia menor y en la fase final del cultivo, pueden aparecer células de tipo sinthicial, en las que una masa citoplasmática, de bordes imprecisos, alberga centenas de núcleos.

La contaminación fibroblástica es posible, pues durante la sangría la aguja puese aspirar células conjuntivas, así con carácter excepcional, se pueden observar en los cultivos las colonias de fibroblastos con su típico aspecto en forma de huevo frito, con la parte central necrosada. Los fibroblastos no son naturalmente sensibles a la multiplicación del virus de la P.P.A.

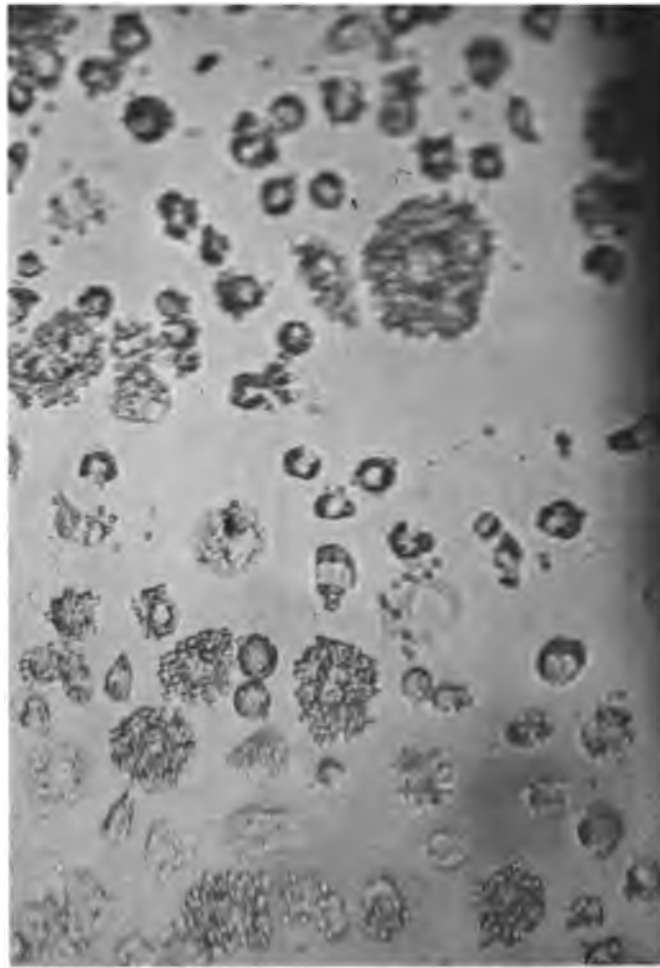
Para el trabajo de diagnóstico, los cultivos no se cambian de medio, y en estas condiciones la degeneración senil de las células se sitúa alrededor de 12 - 15 días. La degeneración está precedida de una fuerte vacualización del citoplasma y de picnosis nuclear.

¿Qué alteraciones produce la multiplicación del virus en el macrófago, que puedan ser observadas al microscopio ?

Si observamos el cultivo "en fresco", o sea sin coloración, podemos observar la hemadsorción y dos o tres días después un fuerte efecto citolítico.

IMAGENES DE HAD

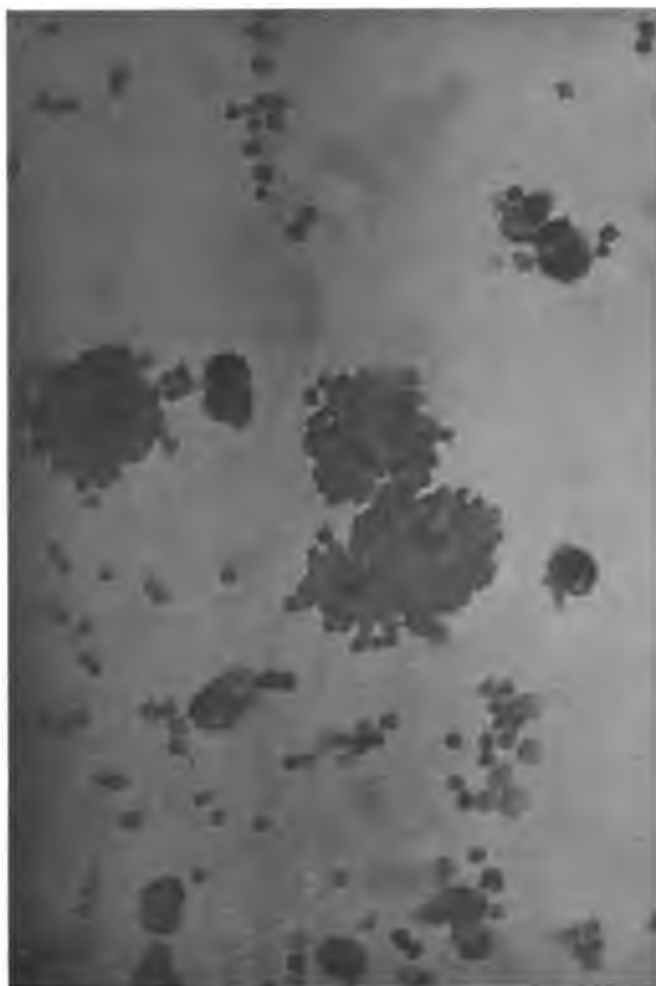
Observación en fresco. (sin coloración)



Sobre el cultivo fijado y teñido por los colorantes ordinarios (tipo coloración de Giemsa) podremos observar además, las alteraciones nucleares y la inclusión de tipo acidofilo que presenta el citoplasma.

IMAGEN DE HAD

Observación después de la coloración con
Giemsa



¿Cómo se puede realizar el diagnóstico de rutina ?

Tres tubos de cultivo se inoculan a partir de cada muestra, los tubos se observan diariamente por ocho días. La presencia de Had seguida dos o tres días después de la destrucción del cultivo es un signo inequívoco de la presencia y multiplicación del virus de la P.P.A.

Como la vida del cultivo es de 12-15 días, es necesario realizar la inoculación tan pronto como la transformación de haya realizado (2-4 días) para disponer de un período de observación útil de ocho días.

Los cultivos que se destruyen, si haber presentado Had antes que los testigos no inoculados, serán objeto de subcultivos que permitirán la aparición de la hemoadsorción o una lectura negativa durante ocho días.

La presencia de gérmenes de contaminación, se revela generalmente por la turbidez del medio de cultivo, la siembra del sobrenadante sobre medios bacteriológicos nos confirmará que la lysis es debida a bacterias contaminantes.

En el inóculo, pueden igualmente existir sustancias tóxicas para el cultivo, debidas en la mayoría de los casos a transformaciones producidas por la putrefacción, generalmente estas sustancias no ejercen su acción tóxica a nivel del segundo sub-cultivo, por lo que con cierto retraso, el diagnóstico puede continuarse en un gran número de casos.

Pero de modo general, en los dos últimos casos (fuerte contaminación bacteriana o toxicidad del inóculo) es preferible empezar el análisis a partir de otra muestra de la misma procedencia, y en mejor estado de conservación, pues la experiencia demuestra que se gana más tiempo al establecer el diagnóstico de la explotación procediendo de esta manera, que ensayando de esterilizar un inóculo fuertemente contaminado. Por otra parte el cultivo de leucocitos es muy sensible a la acción de los antibióticos, por lo que evitaremos sus concentraciones excesivas.

Por último nos podemos encontrar, en ausencia de Had, con un efecto de lisis reproductible y en ausencia de contaminaciones bacterianas. En este caso la lisis puede estar motivada por la multiplicación de un virus P.P.A. o por el virus de la Enfermedad de Aujeszky.

En efecto, sabemos que con carácter excepcional se pueden encontrar cepas de P.P.A. aisladas del campo que no presentan de forma momentánea (o aún más excepcionalmente, de forma definitiva) el fenómeno de Had. Por otra parte, conocemos que el virus de la enfermedad de Aujeszky se multiplica en el cultivo de leucocitos, produciendo una lisis, en ausencia de Had.

Así en estos casos debemos proceder a un diagnóstico diferencial entre P.P.A. y Enfermedad de Aujeszky. Para ello disponemos de las técnicas siguientes:

VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE AUJESZKY	VIRUS DE LA P.P.A.
Inoculación al conejo	Inoculación al cerdo y búsqueda
Seroneutralización en cultivos de tejidos	
Inmunofluorescencia en cultivo de leucocitos	Inmunofluorescencia en cultivos de leucocitos

Ver detalles técnicos en anexos.

Insistimos sobre el carácter excepcional de las cepas que han perdido definitivamente la propiedad de formar hemoadsorpciones, y recordemos, que si la Had puede estar momentáneamente inhibida, la multiplicación de muestras ayuda a resolver esta dificultad, en un mínimo de tiempo.

Resumiremos esta técnica de Had diciendo que es la más segura, después de la reproducción experimental de la enfermedad, sobre la que presenta la ventaja

de tiempo y economía.

En determinados casos, ambas técnicas pueden complementarse; así, si hemos inoculado un cerdo con un material sospechoso y el animal responde con aumento de temperatura, la inoculación al cultivo de leucocitos de unas gotas de sangre del animal febril, es suficiente para poder establecer un diagnóstico de P.P.A. con un ahorro de tiempo evidente, con relación a la evolución completa de la enfermedad experimental.

Una vez dominados estos dos diagnósticos (reproducción de la enfermedad y test de hemoadsorción), empezaremos a interesarnos en un tercero, que es el diagnóstico por inmunofluorescencia.

Es un buen método de diagnóstico que une la observación de las lesiones celulares producidas por la multiplicación del virus, a la especificidad de la reacción antígeno anticuerpo, basado en la coloración. Como el antígeno de base, está representado por la inclusión citoplasmática, su lectura e interpretación es relativamente fácil, como en el caso de la rabia o de otras enfermedades en las que el antígeno se presenta en forma de inclusión y no de coloración difusa.

Si hemos considerado este método en tercer lugar es por dos razones:

- . La primera, porque aplicada directamente a las muestras, pierde en seguridad lo que gana en precocidad.
- . La segunda, porque aplicada a través del cultivo de leucocitos, solamente será necesaria en caso de ausencia de Had, que es por sí sola suficiente para establecer el diagnóstico.

En general es necesario un equipo en microscopio ultravioleta y un suministro regular de globulinas marcadas.

La base científica de la inmunofluorescencia es la siguiente:

Visualiza la reacción antígeno-anticuerpo.

El antígeno está representado por la inclusión citoplásmica, producida por la multiplicación del virus. El anticuerpo es producido por el animal convalesciente, o inoculado experimentalmente con un virus débil poder patógeno.

Los anticuerpos se conjugan a un fluorocromo, llamado isotiocianato de fluoresceína I.T.C.F. Que emite una luz fluorescente cuando se le ilumina de pequeña longitud de ondas, como es la luz ultravioleta.

Si la unión antígeno anticuerpo se realiza, la observación a la luz ultravioleta revela la presencia de luz fluorescente sobre las inclusiones de las células infectadas. En ausencia de antígeno la luz fluorescente no se manifiesta.



Cuerpo de Inclusión.

Segunda fase de organización del cuerpo de inclusión, observado en inmunofluorescencia.

Los detalles técnicos y gráficos explicativos se encuentran en los anexos.

Si observamos en forma seriada la multiplicación del virus P.P.A. sobre una célula por I.F. podemos diferenciar tres tiempos:

1. La fluorescencia se localiza en forma pulverulente, en una determinada zona del citoplasma.
2. La fluorescencia se presenta bien delimitada sobre la inclusión.
3. La fluorescencia se visualiza de manera intensa sobre todo el citoplasma.

Estos tres tiempos corresponden a los que ya habíamos observado, por la coloración ordinaria y es el segundo tiempo el que se identifica con la formación del cuerpo de inclusión y el que más garantías ofrece, bajo el punto de vista diagnóstico, tanto por la facilidad de la lectura, como por su especificidad.

La técnica de I.F. puede aplicarse en el diagnóstico en dos momentos diferentes:

1. Sobre las muestras recibidas y en especial sobre los cortes de amígdalas.
2. Sobre el cultivo de leucocitos infectados con el inóculo preparado a partir de las primeras muestras recibidas.

La técnica de coloración puede realizarse indistintamente de dos formas diferentes que reciben el nombre de I.F. Directa (cuando los anticuerpos P.P.A. van directamente conjugados al I.T.C.F.0 o I.F. Indirecta (que precisa dos tiempos de coloración: en el primero se realiza el contacto antígeno-suero anti P.P.A. no marcado : en el segundo se evidencia esta reacción por la acción de un suero anti-suero marcado). Detalles técnicos y gráficos en anexos.

Un laboratorio de patología porcina, debe continuar en paralelo a realizar el diagnóstico de la P.P.C. y para ello ¿qué hacer una vez que hemos abandonado el diagnóstico por reproducción experimental de la enfermedad, sobre el cerdo?

En un primer tiempo podríamos continuar realizando el diagnóstico por inoculación al conejo, otro diagnóstico podría hacerse más tarde empleando la Inmunofluorescencia, montando así simultáneamente la técnica para la P.P.A. y para la P.P.C.

El diagnóstico de la P.P.C. por inoculación al conejo, fue descrito por el Profesor Thomas del Institut National de Recherches Veterinaires de Uccle, Bruselas, Bélgica, y ha sido aplicado en gran escala por el servicio de diagnóstico de la P.P.C. del Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires d'Alfort, Francia.

Tiene su base científica en el hecho siguiente:

Detalles técnicos y gráficos explicativos en anexos.

La inoculación intravenosa al conejo de ciertas cepas del virus de la P.P.C., llamadas hipertermizantes, producen en el animal la elevación de la temperatura en más de un grado centígrado durante veinticuatro horas, lo que es fácilmente detectable.

Basándose en estas observaciones el método de diagnóstico consiste en:

- . Inocular el material problema en la vena auricular del conejo.
- . Tomar su temperatura tres veces por día durante siete días.
- . Inocular un virus hipertermizante en la vena del mismo animal.
- . Tomar la temperatura tres veces por día durante siete días.

Los diferentes tipos de respuesta y su interpretación se resumen en el siguiente cuadro.

1 ^a . Inoculación Material sospechoso	2 ^a . Inoculación Virus hipertermizante	Diagnóstico
No hipertermia	No hipertermia	P.P.C.
No hipertermia	Hipertermia	Ausencia de P.P.C.
Hipertermia	No hipertermia	Presencia de un virus lapinizado, en el material sospechoso.
Hipertermia	Hipertermia	Ausencia de P.P.C.. Contaminación vacu- raria del material sospechoso.

Esta técnica es de realización simple, y presenta un alto margen de seguridad. Por otra parte permite la identificación de las cepas lapinizadas (tipo chino u otras), que pueden aislarse en el cerdo como consecuencia de una vacunación.

Sus inconvenientes están ligados al factor tiempo, pues la respuesta positiva pide de 9 - 12 días y la negativa 14 días.

La técnica de Inmunofluorescencia se aplica de forma análoga que para la P.P.A.: sobre cortes efectuados sobre las muestras recibidas (en especial las amígdalas), o sobre el virus pasado por el cultivo de tejidos, en este caso se emplea la línea de riñón de cerdo PK 15, especialmente seleccionada por su sensibilidad a la multiplicación del virus de la P.P.C.

La multiplicación del virus de la P.P.C., se manifiesta por una fluorescencia generalizada del citoplasma, el núcleo no retiene el colorante. A partir de la primera célula infectada, las células vecinas se infectan por contagio, dando origen a placas de infección de 10-20 células.

Los detalles técnicos y los esquemas explicativos se encuentran en los anexos.

En resumen, la metodología a seguir, para un país que partiendo de cero y quisiera montar un dispositivo de diagnóstico, que cubriera a la vez P.P.C. y la P.P.A., sería:

	P.P.A.	P.P.C.
1er. tiempo	Prueba de inmunidad cruzada	
2do. tiempo	Had, sobre el cultivo de leucocitos	Inoculación al conejo
3er. tiempo	Immunofluorescencia a. sobre órganos b. sobre cultivo de leucocitos	Immunofluorescencia a. sobre órganos b. sobre cultivo de PK 15

La literatura ha señalado un hecho que hemos podido comprobar personalmente, y que tiende a mostrar la necesidad de emplear simultáneamente el diagnóstico de las dos enfermedades. Este hecho es el aislamiento de los dos virus sobre el mismo órgano de un mismo animal. Este hecho es raro pero existe.

Diagnóstico por detección de anticuerpos.

El virus de la P.P.A. es un virus dotado de un alto poder antigénico, en contacto con el cerdo provoca la producción rápida y en concentraciones relativamente elevadas de toda clase de anticuerpos, salvo como ya mencionamos, los anticuerpos seroneutralizantes y protectores.

El diagnóstico por detección de anticuerpos es posible, relativamente precoz, puede realizarse por diversas técnicas.

Generalmente es un diagnóstico retrospectivo, que se aplica una vez pasado el momento crítico de la onda epizootica. En el primer tiempo de la invasión viral, los esfuerzos se concentran en la detección del virus y en la eliminación de los focos activos. Una vez que esta política dé sus frutos y que la cantidad de focos activos esté en disminución, o momentáneamente eliminada es el mejor momento para proceder a los análisis serológicos, que según los casos nos confirmarán la desaparición del virus, o señalarán la presencia de supervivientes a la enfermedad, o sea, la existencia de portadores sanos en la mayoría de los casos.

El diagnóstico por detección de anticuerpos es del mayor interés y se realizará en los Laboratorios habilitados, lo más rápidamente posible-

Entre las diferentes técnicas que pueden ser aplicadas destacan:

Inhibición de la hemoadsorción	I.H.A.D.
Fijación del complemento	F. de C.
Precipitación en agar	P.A.
Inmuno-electro-osmo-foresis	I.E.O.F.
Enzima linked inmunosorbent assay	ELISA
Inmunofluorescencia indirecta	I.F.I.
Inmuno-peroxidasas	I. P.

Entre todas ellas la que ofrece el mayor coeficiente de seguridad en el momento actual es la Inmunofluorescencia Indirecta, por lo que ha sido designada como técnica de referencia.

Los anticuerpos inhibidores de la HAD se presentan en forma tardía y en bajas concentraciones lo que hacen que la técnica de IHAD, se emplee más como técnica de investigación que para la práctica del diagnóstico. En investigaciones empleada ya que según la mayoría de los autores, es la única técnica serológica capaz de establecer diferencias entre los dos serotipos existentes del virus. Sus condiciones técnicas y esquemas explicativos se encuentran en el anexo.

Como el principio de la inmunofluorescencia ya ha sido descrito, nos limitaremos a señalar las particularidades de su aplicación en la búsqueda de anticuerpos.

En primer lugar, el soporte del antígeno en un cultivo celular clásico, ya que la presencia de un tapíz confluyente facilita la lectura de las inclusiones, el virus es en consecuencia una cepa adaptada al sistema celular elegido, puesto que espontáneamente el virus se multiplica solamente sobre el cultivo leucocitario.

Las células propuestas por el laboratorio de referencia, son las de las líneas de riñón de mono M.S. En nuestro laboratorio estas líneas se acomodaron fácilmente a nuestras condiciones de trabajo, ya que poseen un buen rendimiento celular y las células presentan una forma poligonal con un gran citoplasma, lo que permite una fácil identificación del cuerpo de inclusión inducido por la multiplicación del virus adaptado. estas ventajas determinaron la adopción del sistema en nuestro laboratorio para el trabajo cotidiano. Señalaremos igualmente que la marcha técnica a seguir es la llamada indirecta, que se realiza en dos tiempos.

- . En el primero se ponen en contacto el virus indicado con el suero de cerdo a analizar.
- . En el segundo se pone en contacto un suero antiglobulinas de cerdo marcado con el I.T.C.F., sobre la resultante del primer tiempo. La presencia de anticuerpos en el suero problema se traduce por la presencia de fluorescencia sobre el antígeno viral.

Las globulinas pueden estar marcadas con otras sustancias diferentes de los fluorocromos, así se han empleado con este fin ciertas enzimas, como la peroxidasa, lo que ha dado origen a una técnica análoga en su principio, pero diferente en su relación que es la Immunoperoxidasa.

La coloración ordinaria de la peroxidasa, que revela la presencia de la reacción antígeno-anticuerpo, es visible al microscopio de luz incandescente que constituye la principal ventaja del método.

Sus principales limitaciones en relación con la I.F.I. son:

- . Superior complejidad de manipulaciones.
- . Observación más delicada, pues es más fácil detectar una luz verde sobre un fondo negro, que un color marrón sobre fondo amarillo.
- . Mayor dificultad de encontrar los reactivos en el comercio.

Basados en el mismo principio, detección de la unión antígeno-anticuerpo por la presencia de una enzima, revelable por coloración, se ensaya de aplicar el método ELISA (Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay).

Este método, que se aplica corrientemente en el estudio de otros virus, está en período de adaptación experimental en el caso del virus que nos ocupa. El antígeno es el virus de la P.P.A. purificado y concentrado. El soporte del antígeno es material plástico, lo que evita el empleo del cultivo de tejidos en la manipulación de la reacción. La técnica se realiza en tres tiempos:

. En el primero se ponen en contacto el antígeno conocido y el suero problema.

. En el segundo, se hace actuar el suero antiglobulinas cerdo, marcado con la enzima.

. En el tercero, se colorea la enzima.

La lectura se realiza con un espectro-colorímetro, que en una doble lectura nos indica la diferencia existente entre la reacción testigo y aquella en la que la reacción se ha realizado.

De forma general, la técnica precisa de un espectro-colorímetro que suele ser caro, pero tiene la ventaja de poder tratar un gran número de suero por unidad de tiempo, en realidad lo que se opone a su empleo en la práctica diaria, es que presenta una positividad por exceso, posiblemente debida a una imperfecta purificación del antígeno, por lo que un cierto número de investigaciones se realizan en el momento actual en este sentido.

Basado en la presencia de anticuerpos precipitantes se pueden emplear dos modalidades técnicas:

Precipitación en Agar - Ouchterlony

Es una técnica poco sensible, sobre todo en razón de la escasa elaboración del antígeno empleado. La unión antígeno-anticuerpo se realiza por difusión espontánea, lo que precisa un cierto tiempo y una cierta concentración de reactivos*, estos inconvenientes se eliminan con el empleo de la Inmuno-electro-osmo-foresis.

Detalles en Anexo.

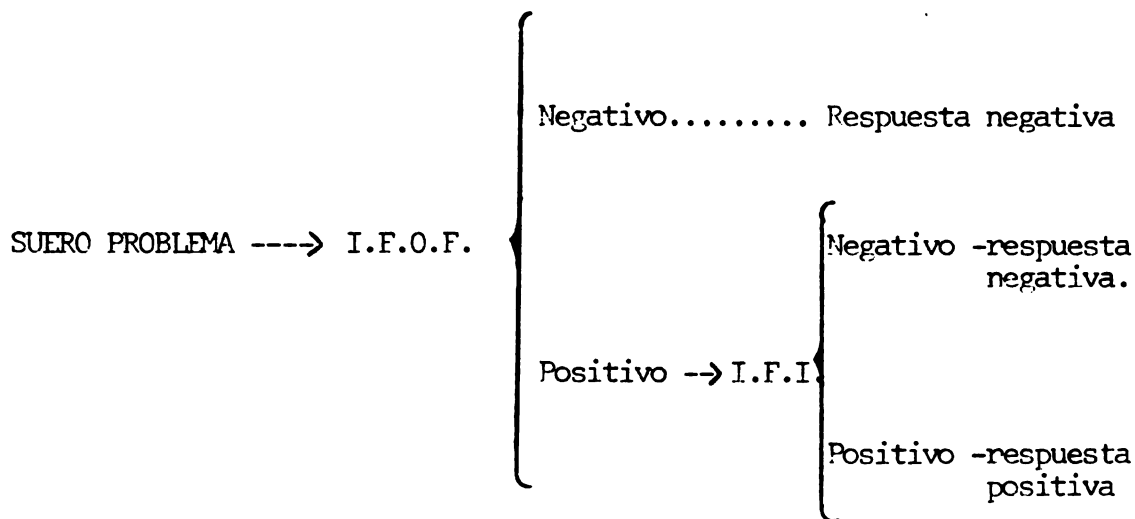
* Basado en el mismo principio el Dr. Pan y Coll U.S.A. propone el método de Difusión radial para la identificación viral. La placa de agar lleva incorporado el suero control anti-P.P.A., así alrededor de la cúpula donde se deposita el inóculo problema, se forma en caso de positividad un anillo de precipitación más o menos intenso según la riqueza en virus del antígeno.-

La unión antígeno anticuerpo se ve acelerada por el paso de la corriente eléctrica a través de la placa de agar, sobre un aparato de electroforesis, que constituye el único aparato especial que interviene en la reacción.

Su mayor inconveniente es la preparación de antígenos suficientemente concentrados y purificado, pues como en el caso de ELISA, la técnica adolece de un exceso de positividad.

La I.E.O.F., ha pasado la fase experimental, ha sido y es empleada en los países contaminados, habiéndose revelado como una buena técnica para preseleccionar los sueros.

En efecto, como en las condiciones actuales su defecto es un exceso de positividad, se la emplea en asociación con la I.F.I. de la siguiente manera:



Es decir, los sueros positivos en I.F.O.F., se repasan en I.F.I. para controlar su positividad.

La Fijación de Complemento.

El método es universalmente conocido para insistir en sus bases científicas o en sus múltiples modalidades técnicas. Existe la posibilidad de emplearla, pero en la práctica se ve limitada por tres inconvenientes mayores:

- . El poder paracomplementario del suero de cerdo.
- . La complejidad de preparación del antígeno.
- . Detecta únicamente los anticuerpos precoces, lo que la hace poco práctica para la detección de enfermos crónicos, supervivientes o portadores sanos.

La inhibición de la Hemoadsorción.

Se trata de una técnica de investigación que no se emplea en el diagnóstico cotidiano.

Los anticuerpos que detecta impiden la unión del hematie al leucocito infectado, lo que produce la inhibición del fenómeno de Had, (las otras manifestaciones de la multiplicación viral, degeneración nuclear, inclusión y lisis, se presentan normalmente), la inhibición se produce a condición de que el virus y el suero empleados, pertenezcan al mismo tipo serológico. Ya hemos señalado que es la única técnica capaz de establecer diferencias serológicas entre los virus de la P.P.A. Esta particularidad, descrita por Malmquist, permitió comprobar que las epizootias portuguesas de 1957 y de 1960 tenían como origen dos cepas serológicamente diferentes.

Antes de cerrar el capítulo de diagnóstico serológico, repetiremos que como el virus induce la formación de un gran número de anticuerpos en concentración y tiempo suficientes, una gran cantidad de técnicas o de modalidades técnicas pueden ser empleadas, desde las más simples a las más elaboradas.

Ante esta amplia gama de posibilidades, la prudencia sugiere el empleo de

un esquema simple que haya hecho sus pruebas frente a la enfermedad, y con un coeficiente de seguridad elevado y demostrado. Tal es el caso de la I.F.I., que debe ser considerada como la técnica de referencia para el diagnóstico serológico de la P.P.A.

Esta técnica puede estar precedida, para la selección de sueros, de la I.E.O.F. en las condiciones indicadas anteriormente. Este scrining podrá ser igualmente realizado, en un futuro próximo por la técnica ELISA, cuyos resultados experimentales son superiores a los de la I.E.O.F.

Aparte la seguridad las ventajas del empleo de la I.F.I., para un laboratorio que se monta son las siguientes:

- Empleo del mismo material que para el diagnóstico por identificación viral.
- La lectura e interpretación son las mismas que para el diagnóstico por identificación viral.
- Las globulinas marcadas necesarias para la reacción son fáciles de preparar y no necesitan manipulaciones con material infeccioso; por otra parte se las encuentra ya preparadas en el comercio internacional, en condiciones convenientes de conservación y precio.

El único inconveniente, para este supuesto laboratorio que empiece a equiparse en estas técnicas, sería la incorporación al trabajo de una línea celular y de una cepa de virus a ella adaptada. En este caso un ahorro de tiempo y de material se consigue con la mediación del laboratorio de referencia, que puso a punto la técnica y conserva uniformes las calidades de sus reactivos.

VIII PRONOSTICO

Considerado individualmente, la enfermedad tiene un pronóstico "muy grave", dado su índice natural de mortalidad. En las evoluciones más benignas el pronóstico es el mismo ya que el animal recuperado continúa albergando el virus, que va a terminar por causarle la muerte después de un período de portador variable.

Considerado colectivamente el pronóstico es, igualmente desesperado; puesto que en ningún caso, una explotación porcina que ha tenido contacto con el virus de la P.P.A., (y por leve que haya sido el episodio clínico), podría considerarse como una explotación sana y en consecuencia rentable. Solamente, la renovación total y completa de los animales, después de una severa desinfección de local y materiales, podrá restituirse a la explotación una economía rentable.

IX TRATAMIENTO

No existe ningún agente quimioterapéutico capaz de impedir la multiplicación del virus de la P.P.A. en el organismo del cerdo.

La brevedad del capítulo tradicionalmente dirigido a los colegas veterinarios que practican la clínica porcina, incita a completarle con la mención de algunas orientaciones de tipo higiénico-sanitarias, especialmente dirigidas a aquellos que ejercen en un país recientemente contaminado.

- Ante una piara de cerdos sospechosa de padecer la peste porcina, las intervenciones terapéuticas son inútiles e incluso contraindicadas. Si se trata de la P.P.A., la intervención no aporta ningún auxilio a los animales. Si se trata de la P.P.C. es tarde para aplicar la vacunación y los sueros que eventualmente pudieran

aplicarse tienen el triple inconveniente de ser caros, su eficacia está condicionada al grado de evolución de la enfermedad y pueden estar contaminados con el virus de la P.P.A., lo que contribuye a diseminar la enfermedad.

- Al realizar una intervención terapéutica o al practicar una vacunación es necesario tener mucho cuidado con el empleo de frascos multidosis, y en ningún caso emplear el mismo frasco en dos granjas diferentes. Esto obligará a veces a destruir el exceso de medicamento o de vacuna, antes de salir de la explotación.

- Lavarse las manos, cambiarse de blusa, limpiar las botas, antes de entrar en una explotación, es una precaución mínima a cumplir.

- Antes de salir de la explotación es necesario esterilizar el material que ha sido utilizado, empleando de preferencia la ebullición, los termómetros serán esterilizados con lejía y aclarados abundantemente con agua.

En el interior de la granja, antes de practicar las autopsias necesarias, es conveniente elegir para ello un lugar fácilmente esterilizable y prever el modo de destruir los restos de la autopsia- en general son enterrados y una buena práctica es regarlos abundantemente con cresyl u otro desinfectante de olor fuerte que haga a la carne inconsumible, con el objeto de evitar desenterramientos por parte de animales domésticos o salvajes.

Si se emplea la sosa caústica para enterrar los animales, cuidar de recubrirlos con suficiente de este producto antes de añadir tierra a la fosa.

De manera general, es necesario cuidar todos los detalles que derivan de la higiene elemental, sin miedo a caer en exageraciones, para evitar así que los veterinarios sean acusados de contribuir a la propagación de la enfermedad.

X PROFILAXIS

La profilaxis se establece una vez estudiadas e interpretadas la observaciones virológicas, clínicas y epidemiológicas.

Clásicamente se divide en:

1 Profilaxis Médica, que tiene como finalidad la protección inmunológica de los animales.

2 Profilaxis Sanitaria, que estudia el conjunto de medidas higienico-sanitarias que se oponen a la aparición y diseminación de la enfermedad.

1 Profilaxis Médica

La profilaxis médica toma su base en la inmunidad.

La inmunidad puede ser activa, inducida en el animal por la introducción del virus; o pasiva provocada por la inyección de anticuerpos.

Además, la inmunidad activa puede ser natural, si el virus que la causa se encontrara en el medio externo, o provocada si la inducción es la consecuencia de una inoculación experimental.

Tal es el caso de la vacunación, cuya finalidad es producir una inmunidad activa y provocada, a partir de un virus que ha perdido su poder patógeno pero que conserva su poder antigéno.

La manifestación más aparente y controlable de la vacunación, a nivel del laboratorio, es la aparición de anticuerpos en el suero del animal, y entre los diferentes anticuerpos así producidos, los que juegan el papel más importante son los protectores, que se pueden identificar "in vivo" por las técnicas inmunológicas e "in vitro" por las serológicas.

. La inmunidad del virus de la P.P.A.

La inoculación del virus de la P.P.A., produce en el cerdo un estado inmunitario que puede constatarse por la aparición de anticuerpos específicos en el suero.

Esta respuesta tiene como originalidad la ausencia de anticuerpos protectores, y la inoculación viral va seguida, en un plazo más o menos breve, de la muerte del animal.

Durante el período de tiempo que va de la inoculación a la muerte el animal manifiesta un estado de resistencia a la inoculación de una segunda cepa viral de agresividad superior a la inicial. Así la inoculación de una cepa de virulencia modificada, va seguida de la protección frente a la cepa homóloga plenamente virulenta.

Se considera como virus homólogo, el virus patógeno del que se partió para realizar la modificación, por oposición a virus heterólogo que es el aislado en focos que difieren geográficamente.

Los estudios realizados a partir de estos animales, tienden a demostrar que la resistencia así lograda, se realiza siempre en presencia del virus que la provocó, lo que indica los estados de resistente y de portador.

Sin embargo, en una última serie de experiencia, los resultados obtenidos parecen indicar que en animales protegidos experimentalmente y en ausencia de reinfección, el virus podría desaparecer del organismo en un plazo de 6 a 9 meses, pasados los cuales, el animal vuelve a ser sensible al virus, aunque conserva una serología positiva.

La obtención de cepas modificadas es relativamente fácil, para un laboratorio de virología, y los pases seriados por un sistema celular son suficientes para lograr una vez la fase de adaptación superada, la modificación del poder patógeno. De una manera general la inoculación de estas cepas se revela peligrosa e ineficaz.

Peligrosa, porque el poder patógeno persiste disminuído pero presente, lo que acaba por producir la muerte del animal.

Ineficaz, ya que como el poder antigéno no se modifica, el animal no producirá los anticuerpos protectores deseado y solamente resistirá a la agresión viral por la presencia del virus que puede ser eliminado en no importa qué momento con las consecuencias epidemiológicas que esta situación conlleva.

El virus de la P.P.A. no ha presentado inmunidad cruzada con ninguno de los virus ensayados, lo que impide pensar en una vacuna heterologa.

Los agentes inactivantes, después de aplicar los protocolos adecuados, logran anular el poder patógeno del virus, pero la inoculación al cerdo del producto inactivado no le protege frente al virus patógeno ni homólogo ni heterólogo.

La inmunización pasiva tampoco es realizable por la ausencia de anticuerpos protectores en el suero de los animales convalescientes.

De forma general existen dos ejes principales de investigación para la obtención de una vacuna.

- La primera consiste en el estudio sistemático de las cepas aisladas de las diferentes epizootias, para tratar de detectar una mutación espontánea.

- La segunda consiste en fraccionar el virus, para poder estudiar el poder antigéno de cada una de estas fracciones.

Desafortunadamente es necesario cerrar el capítulo de Inmunización o Profilaxis Médica con la constatación de un fracaso casi total, con unas perspectivas moderadamente optimistas y a largo plazo

2 Profilaxis Sanitaria

Delante de la imposibilidad de poder aplicar la profilaxis médica, la lucha contra la enfermedad solamente puede realizarse a través de la Profilaxis Sanitaria.

Se trata de una profilaxis posible y eficaz, como lo demuestran los ejemplos de Francia, Italia, Cuba, etc., pero no siempre fácil de aplicar, pues consideraciones diversas pueden limitar su total aplicación. Entre otras:

- Consideraciones de tipo epizootiológico, debidas a la extensión que puede tomar la enfermedad sobre todo si evoluciona en forma inaparente.

- Consideraciones de tipo económico, que enfrentan los gastos ocasionados por la profilaxis y las pérdidas producidas por la enfermedad. En el contexto económico debemos tener presente que las pérdidas causadas por la P.P.A., son difíciles de valorar, sobre todo en lo que se refiere al comercio exterior, que se pudiera ver afectado no solamente en lo que respecta al cerdo y productos derivados.

- Consideraciones de tipo político-social que no dejan nunca de aparecer cuando se trata de aplicar la profilaxis sanitaria.

- Consideraciones de tipo financiero, en lo que concierne la movilidad de créditos e indemnizaciones en un momento determinado.

Una vez superadas todas estas consideraciones hay que abordar los problemas de la profilaxis con la decisión y los medios necesarios para realizar las operaciones rápida y rigurosamente.

Las autoridades sanitarias y veterinarias, responsables de la defensa de la cabaña nacional y encargadas de impedir la entrada de la P.P.A., o eventualmente de eliminarla, deben estar en posesión de un plan de lucha contra la P.P.C.,

puesto que una vez controlada esta enfermedad, la lucha contra la primera se ve grandemente facilitada.

Además se debe conocer lo siguiente:

- El censo porcino.
- La distribución de los cerdos en las diferentes regiones, para poder de -
terminar las zonas de mayor concentración sobre las que se ejercerán las medi -
das más rigurosas (Zonas de alto riesgo).
- Los circuitos comerciales, que podrán determinar el emplazamiento de las
eventuales barreras sanitarias.
- Localización y frecuencia de ferias y mercados.
- El control y exámen sistemático de los sacrificios realizados en los
mataderos y frigoríficos.

De modo general, cuando se proyecta la profilaxis de una país, de una re -
gión natural, o de una propiedad privada, hay que estudiar de manera "a profon -
di" los tres parámetros siguientes:

- Defensa de los animales sanos.
- Identificación de los animales enfermos.
- Destrucción de los animales enfermos y de los agentes de diseminación.

A. Defensa de los animales sanos.

En un país indemne: Equivale a la defensa de las fronteras del país. Así se ejercerá una defensa sanitaria del más alto nivel sobre:

- . Los cerdos importados o en tránsito por el país.
- . Mercancías, maletas y pasajeros procedentes o habiendo transitados
por países contaminados.
- . Destrucción inmediata y sistemática de los restos de la comida ser -
vida en los transportes aéreos, marítimos o terrestres, con procedencia

o escala en países contaminados.

- . La prohibición de importar de países contaminados, productos derivados del cerdo, así como productos terapéuticos de origen porcino o a él destinados.
- . Aplicar un sistema cuarentenario sobre los animales importados.

En un país contaminado: la lucha por la defensa del animal sano es más fácil en razón del libre comercio existente al interior de cada país, pero la aplicación de ciertas medidas de tipo general, pueden ser la base de una política sanitaria coherente.

Así se tomarán toda clase de medidas que contribuyan a:

- . La difusión del conocimiento de las zonas contaminadas.
- . La generalización de la vacunación contra la P.P.C., con prohibición absoluta de emplear aquellas en las que intervino el cerdo para su preparación.
- . Prohibir el empleo de los sueros de origen cerdo, con fines terapéuticos o profilácticos
- . Realizar un inventario de los ectoparásitos del cerdo.
- . Estudiar los desinfectantes y los métodos de desinfección y deseinsectación aplicables a locales y vehículos.
- . Controlar el origen de los animales en ferias y mercados.
- . Controlar mataderos, frigoríficos y fábricas de alimentos que utilicen el cerdo o sus productos como materia prima.
- . Prohibir el vagabundaje de todas las especies animales en general y del cerdo en particular.
- . Prohibir el empleo de los restos de la comida para la alimentación del cerdo.
- . El legislador podrá reservarse el derecho de autorizar el empleo de aparatos de esterilización indicando las condiciones de aplicación y control para su uso.

En una propiedad: las medidas de orden general dictadas por las autoridades sanitarias, deberán ser completadas por cada propietario con aquellas que se adapten a su explotación.

Así vigilará:

- . El origen de los cerdos que deba introducir en la explotación. Comprará solamente animales de origen conocido, - los someterá a una cuarentena de al menos diez días, antes de dispersarlos en la propiedad.
- . El origen de los alimentos, de los que deberá conocer su procedencia y composición exactas.
- . Cuidará los contactos indirectos con sus animales, como lo son vehículos de transporte, embalajes, sacos, etc.
- . Cuidará que las cochiqueras estén completamente cercadas, prohibiendo el paso de personas o animales. Las puertas de entrada deberán estar provistas de un sistema de desinfección tanto para el personal como para los vehículos.
- . El personal encargado de los animales, será objeto de una cuidadosa selección, en la que aparte de los conocimientos profesionales se valorarán sus reflejos "higiénicos", así como la ausencia de contactos con otros animales fuera de la explotación.

La observancia de estas reglas sanitarias simples, es suficiente para explicarnos por qué en el interior de una zona contaminada hay explotaciones que no son atacadas por la enfermedad.

B Identificación de los animales enfermos.

La identificación de los animales enfermos comienza en el campo y termina en el laboratorio de diagnóstico.

El conocimiento de las formas que la enfermedad puede presentar y un cierto grado de sensibilización a su aparición, son las condiciones que determinarán que el propietario alerte rápidamente al veterinario, que a su vez tomará las muestras a enviar al laboratorio, con lo que se inicia el proceso administrativo profiláctico.

En epidemiología, minimizar el tiempo transcurrido entre la presentación de la enfermedad y la implantación de las primeras medidas sanitarias, es una de las claves del éxito.

El laboratorio de diagnóstico es el elemento indispensable para la identificación del virus, y en razón de esta importancia un cierto número de consideraciones serán desarrolladas.

En primer lugar serán tratados los laboratorios internacionales, antes de abordar el capítulo de la instalación de los laboratorios nacionales, para facilitar su presentación dividiremos los laboratorios internacionales en tres categorías: Laboratorios de Referencia, Laboratorios de países, que por sufrir o haber sufrido la enfermedad practican un diagnóstico cotidiano, y Laboratorios de países que sin haber sufrido la enfermedad están autorizados por sus autoridades a trabajar con el virus de la P.P.A.

Laboratorios de Referencia.

Son los depositarios del capital científico de la P.P.A.

Conservan y estudian las cepas virales aisladas en las diferentes epizootias, producen y estudian cepas modificadas, conservan y estudian los sueros correspondientes, unifican las técnicas de diagnóstico, procuran los antígenos y los sueros necesarios para la aplicación de técnicas, etc.

El Laboratorio de Referencia Oficialmente reconocido es el Laboratorio Nacional de España, antiguamente conocido con el nombre de Patronato de Biología Animal, y cuya dirección y delimitación actual es:

Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias
Departamento de Virología Animal
Embajadores No. 68
Madrid, España.

En razón de su proximidad con los recientes focos de América Central y del Sur, es igualmente interesante anotar la dirección del Laboratorio Veterinario de Estados Unidos, que tanto ha contribuido al estudio del virus y a las técnicas de diagnóstico.

Plum Island Animal Disease Center
P.O. Box 848
Greenport. Long Island.
New York 11944
U.S.A.

Entre los laboratorios que han empleado o emplean en sus país las técnicas de estudio y diagnóstico de la P.P.A. citaremos:

Laboratorio Nacional de Investigaçao Veterinaria
Estrada de Benfica 701
P. Lisboa 4
Portugal.

Laboratoire Central de Recherches Veterinaires
22, rue Pierre Curie
94703 Maisons Alfort Cedex
Francia.

Instituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e della Marche
Via S. Costanzo 14
I. 06100 Perugia
Italia.

En Latinoamérica, mencionaremos el laboratorio cubano, cuya actividad fue decisiva en la erradicación de la enfermedad en 1971.

Centro Nacional de Investigaciones Científicas
 Universidad de la Habana
 Cuba.

Es necesario añadir a esta lista la meritoria labor realizada por el:
 Instituto de Microbiología
 Universidad Federal do Rio de Janeiro
 Río de Janeiro
 Brasil.

que ha asegurado competente y eficazmente el período de transición situado entre la aparición de la enfermedad en el país hasta 1982, fecha en la que el Laboratorio del Ministerio de la Agricultura se hace cargo de estos trabajos.

LANARA
 Pedro Leopoldo
 Minas Gerais
 Brasil.

Otros laboratorios que están o han estado autorizados a manipular el virus de la P.P.A., en países que nunca fueron afectados por la enfermedad son los Laboratorios Nacionales de:

Canadá, Investigaciones Veterinarias, Hull
 Inglaterra, Investigaciones de Virus Veterinarios, Pirbright
 Rusia, Investigaciones Viroológicas y Microbiológicas.

Referente a los Laboratorios Nacionales y más concretamente a su creación, tres evidencias ocupan el primer plano:

- Es evidente que cada país debe tener su propio laboratorio.
- Es evidente que sus responsables deben ser veterinarios.
- Es evidente que debe depender directamente de la estructura de

Defensa Zoo-Sanitaria del Ministerio de la Agricultura.

La enfermedad siendo exclusivamente veterinaria y la profilaxis a aplicar cubriendo el conjunto del territorio nacional, sirve de justificación a estas evidencias.

Durante la fase conceptual, un cierto número de criterios deben ser objeto de un estudio previo:

- Cantidad de laboratorios.
- Protección del medio.
- Personal.
- Protocolo de Diagnóstico.

Cantidad de Laboratorios.

Hasta ahora todos los países han empleado en su lucha contra la enfermedad un solo laboratorio, únicamente Italia, en razón de su estructura sanitaria pre-existente, empleó a este fin más de uno de sus Laboratorios Zooprofilácticos.

De modo general, un sólo laboratorio deberá ser suficiente, si las muestras le llegan de todos los puntos del país en buenas condiciones y si su capacidad de trabajo puede absorber la cantidad de muestras necesarias para la buena marcha de la profilaxis nacional.

Protección del medio.

Deberán proyectarse las barreras necesarias para lograr un máximo de aislamiento entre el laboratorio y el medio externo.

Estas barreras se establecerán con una doble intención:

- Del exterior al interior, para defender el trabajo de las contaminaciones procedentes del exterior.
- Del interior al exterior, para impedir la salida de gérmenes que puedan ser el origen de nuevos focos.

Los dos tipos de barreras son importantes, pero daremos una preferencia al segundo con respecto al primero, así, cambio de ropa, ducha, tratamiento de aguas residuales, incineración del material contaminado, etc., deben estar presentes en la mente del organizador.

Personal.

Debe tener las calidades necesarias para responder ante el país y ante la comunidad internacional del diagnóstico y del estudio de una de las enfermedades de mayor repercusión económica de nuestros días.

La trilogía de base exigible a este personal es: competencia, vocación e integridad.

Protocolo de Diagnóstico.

La introducción del virus en un país no infectado, debe normalmente seguir tres fases: la primera de invasión, la segunda de control de la enfermedad y la tercera de erradicación del virus; lo que puede permitir una secuencia del empleo de las técnicas de diagnóstico.

1. Fase de invasión, diagnóstico de los primeros focos; empleo de la técnica de inoculación al cerdo hiperinmunizado contra la P.P.C.

2. Fase de contro; empleo de la criotomía de los focos agudos y de la HAD en todos los casos.

3. Fase de erradicación; se añade al dispositivo precedente la IF sobre el cultivo de leucocitos y la IFI para la detección de animales portadores del virus. Si durante este período la cantidad de sueros a analizar supera la capacidad de la IFI, se podrá introducir una técnica discriminatoria cualitativa (scrining) tal que IEOF o ELISA, estando bien entendido que mientras estas técnicas sigan en fase experimental, los resultados positivos obtenidos con ellas deberán ser obligatoriamente confirmados por la IFI antes de ser considerados como específicos de la P.P.A.

Es decir, el protocolo a adoptar debe obedecer a un razonamiento análogo al que preside el trabajo de los bomberos; así en un primer tiempo hay que localizar el fuego, luego combatirlo impidiendo su extensión y por último eliminar las brasas que pudieran avivarle o dar origen a nuevos focos.

Diagnóstico; medidas sanitarias y encuestas serológicas se adaptan perfectamente, en este orden a esta secuencia, por lo que resulta "chocante" el uso exclusivo de la serología en la primera fase de la lucha, puesto que hace perder el factor rapidez ya que sus primeros positivos no serán detectados hasta los siete días de evolución de la enfermedad y sobre los eventuales sobrevivientes. Esta práctica debe considerarse como un grave error estratégico.

C Destrucción de los Animales Enfermos.

La rapidez en la eliminación de los primeros focos de un país es la mejor garantía de eficacia para la profilaxis sanitaria. Así un procedimiento que a primera vista puede parecer honeroso, se revela como altamente económico.

La eliminación de los focos no puede improvisarse y debe ser estudiada y preparada en sus menores detalles antes de que la necesidad imponga su aplicación.

Los puntos más importantes del estudio a realizar se encuentran en las respuestas a las siguientes preguntas:

- ¿Qué animales debemos eliminar ?
- ¿Cómo lograr la colaboración de los propietarios ?
- ¿Cómo definir el foco ?
- ¿Cómo realizar su destrucción ?
- ¿Cómo reponer el capital cerdo ?

1. ¿Qué animales debemos eliminar ?

Desde el punto de vista higiénico-sanitario una sola respuesta es

posible; es necesario eliminar todos los animales relacionados con un foco de enfermedad.

Las necesidades económicas del país, pueden aconsejar la adopción de una medida menos drástica y en ese caso serán eliminados todos los animales enfermos con manifestaciones clínicas (incluida la fiebre) serán destruidos- los otros serán sacrificados, esterilizados y consumidos localmente.

2. ¿Cómo lograr la colaboración del propietario?

En general, las campañas sanitarias basadas en el sacrificio de los animales, el propietario resiste la eliminación de éstos ya que lo toma como un ataque a sus intereses y bajo el efecto de este trauma su primera reacción es la de no colaborar con la campaña, evitando así al máximo la declaración de la enfermedad.

La falta de colaboración entre propietarios y sanitarios es fatal para la profilaxis, siendo el propietario en definitiva la principal víctima, pues la agresión viral por leve que sea anula la rentabilidad de la explotación.

El propietario debe estar informado y tenido al corriente de los peligros que corre y hace correr, a fin de que pueda adoptar una actitud responsable y consciente, que le incite a aplicar rigurosamente las medidas de profilaxis generales.

Por otra parte, cuando un foco es identificado, es necesario que la eliminación de los animales se realice rápida y rigurosamente sin provocar dramas de tipo económico-social, por los que en un sistema de indemnizaciones debe estar completamente estudiado.

La profilaxis por sacrificio funcionará de una manera válida si las indemnizaciones son justas y su pago se realice sin demora.

Así desde la aparición de los primeros focos el sacrificio y la indemnización pueden intervenir de forma inmediata. La tergiversación en los primeros casos tienen un efecto altamente nocivo para la declaración de lo siguiente:

La colaboración de los propietarios se obtiene por la trilogía:

- Información.
- Concertación.
- Indemnización.

Las dos primeras a realizar antes de la aparición de la enfermedad a fin de poder aplicar la tercera con la rapidez necesaria.

3.¿Cómo definir el foco ?

Según el código Zoo-Sanitario Internacional, editado por la OIE (Office International des Epizooties, 12 rue de PRONY, Paris, Francia), "el foco designa la explotación agrícola, así como sus locales y anexos, en los que ha aparecido una de las enfermedades inscritas en la Lista A", la P.P.A. está incluida en esta lista.

Si por razones diversas el foco no puede delimitarse de esta manera, se considera como foco la parte del territorio en la que según las condiciones locales, no se puede garantizar que los animales receptibles o no, no hayan podido tener un contacto directo con los enfermos o sospechosos que en ella se encuentren.

En el caso particular de ciertas regiones africanas, el foco está representado por la superficie de un dieciseisavo de grado cuadrado en el que la enfermedad se presentó. Considerándose como un sólo foco los diferentes casos que puedan presentarse al interior de esta área.

(Un grado= 111120 metros. 1/16 grados = 6945 metros; así el foco representaría el punto central de un cuadrado de 7 kilómetros de lado).

En general en los casos de explotaciones porcinas intensivas, la aparición de la enfermedad da lugar a la creación de tres zonas:

- Zona Central o foco.
- Zona de Prohibición.
- Zona de Observación.

La zona central está formada por la explotación afectada y sus dependencias.

Las otras dos zonas se disponen en forma de anillo a su alrededor con una profundidad respectiva de dos y ocho kilómetros como mínimo.

En la zona central se procederá de la manera siguiente:

- Visita de los animales.
- Recogida y envío de muestras al laboratorio.
- Censo de identificación de los animales.
- Inmovilización de los animales.
- Prohibición de sacar de la zona otras especies animales y objetos de la explotación.

En la zona de prohibición se procederá a:

- Visita de los animales.
- Censo.
- Inmovilización.

En la zona de observación:

- Visitas periódicas.

El resultado de los análisis del laboratorio determinará la supresión de estas medidas o el sacrificio de los animales de la zona central y la suspensión de ferias y mercados de las otras dos zonas, así como toda manifestación de

tipo a favorecer la diseminación de la enfermedad.

4 ¿Cómo realizar la destrucción del foco ?

Si los resultados de los análisis realizados en el laboratorio muestran la presencia del virus de la peste porcina africana, las autoridades zoo-sanitarias determinarán, las modalidades del sacrificio, el lugar donde se realizará y las vías de acceso a este lugar.

Tres modalidades de sacrificio son las más frecuentemente adoptadas:

- Sacrificio y destrucción de los cadáveres al interior de la explotación afectada.
- Sacrificio en la explotación y destrucción en las industrias especializadas.
- Sacrificio y destrucción en las industrias especializadas.

En el primer caso, el sacrificio se realizará con un mínimo de efusión de sangre y en una zona de la finca lo más pequeña posible. La destrucción de los cadáveres se realizará por incineración, seguida de enterramiento; o por enterramiento directo pero en este caso se intercalará entre los cadáveres capas de sosa caústica- esta capa debe alcanzar por lo mínimo un metro antes de cubrir con la tierra. El conjunto deberá ser recubierto de gruesas piedras que impedirán que los animales salvajes intenten un desenterramiento.

En el segundo caso, el sacrificio se realizará en la finca, como se indica anteriormente, y los cadáveres se trasladaran en "containers" herméticamente cerrados hasta las industrias de transformación, las cuales debidamente autorizadas, procederán a su conversión en grasas, jabones, harina de hueso, etc.

En el tercer caso las autoridades designarán el matadero donde se realizarán los sacrificios en función de su proximidad con el foco, su capacidad y garantías de desinfección, indicando igualmente las vías de acceso y las horas de tránsito. Los animales son transportados vivos- en condiciones tales que sus excreciones no puedan verterse durante el trayecto. Los cadáveres serán destruídos por el sistema previsto para los decomisos del matadero. Es indudable que durante el tiempo que dura el sacrificio, las actividades normales del matadero estarán suspendidas y no comenzarán hasta después de haberse realizado las desinfecciones oportunas.

La destrucción del foco solamente se termina después de la desinfección.

Se emplearán desinfectantes con actividad comprobada frente al virus de la P.P.A., de forma general sosa caústica, lejía, formol y fenol son activos, como igualmente los radicales iodo y ortho-fenil-fenol.

La desinfección, que generalmente es realizada por las industrias competentes debidamente autorizadas, se divide en cuatro operaciones:

1- Inmediatamente después del sacrificio, dejar actuar el desinfectante sobre la zona contaminada.

2- Limpieza de la zona, con eliminación de estiércol, restos de comida, utensilios, etc., las paredes y el suelo se lavarán abundantemente para eliminar la sangre u otros restos que pudieran quedar adheridos.

3- Dejar actuar el desinfectante nuevamente sobre las superficies así limpiadas.

4- Lavado abundante con agua.

Proceder al mismo tiempo a una desinfectación de los locales. La prudencia recomienda repetir los tiempos 3 y 4 días antes de la introducción de nuevos animales.

5 ¿Cómo y cuándo reponer los cerdos ?

El plazo más corrientemente propuesto es de tres meses después de la eliminación del foco con la desinfección de los locales. En zonas muy industrializadas, con instalaciones protegidas y fácilmente desinfectables, este período puede ser reducido a dos meses.

Una práctica recomendable, consiste en introducir en la explotación un mes después de realizada la desinfección, un grupo de cinco cerdos. Estos cerdos deben estar perfectamente identificados y vacunados contra la P.P.C. (la vacunación debió realizarse entre uno y nueve meses antes de la introducción de los animales, que serán observados durante dos meses transcurridos los cuales un test serológico por IFI puede ser realizado, y en todo caso la enfermedad, la muerte o la desaparición de uno de estos animales, obliga a recomenzar el proceso, pero sin las consecuencias dramáticas que hubiera tenido la repoblación total.

Antes de cerrar el capítulo de la Profilaxis, pasaremos en revista algunas consideraciones de tipo general.

El anteriormente mencionado Código Sanitario de la OIE., considera que un país está exento de la P.P.A., cuando "Se ha podido establecer que la enfermedad no ha existido en los últimos tres años". "Este plazo se reduce a seis meses, si el sacrificio sanitario fue aplicado en el país afectado".

En el mismo código, el período de incubación, con relación al comercio internacional, está fijado en seis semanas.

La experiencia ha demostrado que la aplicación rigurosa de estas medidas es suficiente para eliminar la enfermedad durante su período de invasión. Pero su eficacia es menor cuando la enfermedad se ha implantado desde hace cierto tiempo, ya que las presiones económicas, sanitarias y sociales que las medidas imponen no pueden mantenerse a un nivel suficientemente alto de forma

indefinida, y la profilaxis se reduce poco a poco a la constatación de la enfermedad.

En el contexto mundial tres modelos profilácticos confirman esta opinión,

1- Países en los que persiste la enfermedad:

Península Ibérica y Brasil. En los dos casos las medidas sanitarias tuvieron dificultades para ser aplicadas de forma eficaz en la primera fase de invasión, así la Península Ibérica no disponía en 1960 de ninguno de los métodos de diagnóstico que actualmente existen, y España y Portugal, vieron extenderse la enfermedad antes de poder aplicar un diagnóstico eficaz, que tuvo el mérito indudable de trasponer ciertos conocimientos experimentales (como la HAD.) a la lucha sobre el terreno a gran escala. Estos países, pagando así un enorme tributo a la enfermedad, han legado al mundo entero un arsenal de técnicas coherentes y precisas que nos permiten hoy, detectar y eliminar rápidamente la enfermedad.

Diferente es el caso de Brasil, en el que una campaña de contestación indiscriminada frente al diagnóstico serológico, junto con el empleo de la vacuna inactivada con cristal violeta (1) para combatir los numerosos focos de la P.P.C. presentes, hizo que la enfermedad se instalara con manifestaciones subagudas en el sur del país, región de máxima concentración porcina.

En todos estos casos los recursos aplicados y la rapidez de actuación manifestados por las autoridades respectivas no lograron el éxito que merecían, por las causas antes expuestas.

1- Científicos brasileños de la Universidad Federal de Río de Janeiro y del Ministerio de la Agricultura, pudieron constatar la supervivencia del virus de la P.P.A., después de la inactivación del virus de la P.P.C. por acción del Cristal Violeta, lo que pudo contribuir a la extensión de la enfermedad.

En el momento presente, la erradicación en estos países precisa esfuerzos suplementarios como la búsqueda incesante de reservas del virus, a través de encuestas serológicas realizadas en forma global sobre una región o a partir de focos declarados. Una gran labor a realizar para que los resultados sean de acuerdo con la voluntad manifestada por las autoridades sanitarias.

2- Países de gran densidad porcina que han erradicado la enfermedad:

El dispositivo de diagnóstico y las medidas administrativas de profilaxis sanitaria, habiendo respondido como se esperaba, la enfermedad fue erradicada, en un plazo inferior a un año y durante el período de invasión: tres veces en Francia, y dos veces en Italia y en Cuba.

3- Países de pequeña densidad porcina que han erradicado la enfermedad:

Malta, Santo Domingo y próximamente Haití.

La cantidad de cerdos, relativamente baja en estos países, hizo realizable una profilaxis de "stamping out total". En estos casos una vez constatada la presencia de la enfermedad así como la posibilidad de eliminar la cabana porcina, el diagnóstico no tiene otro interés que la anécdota.

Cerraremos el capítulo de la Profilaxis, con un breve resumen de los factores de contagio frente a un acto sanitario simple que tiende a neutralizarlo.

CONTAGIO	DEFENSA
Cerdos: Introducción de enfermos	<ul style="list-style-type: none"> . Cuarentenas . Limitar las compras a granajas de estado sanitario conocido, . Realizar las compras con control veterinario.
Ornithodoros	<ul style="list-style-type: none"> . Conocimiento del parásito. . Desinfectación periódica de locales.
Alimentación	<ul style="list-style-type: none"> . No emplear restos de comidas (incluso si la legislación tolera su empleo después de esterilización al autoclave) . Emplear alimentos compuestos de origen conocido. (una garantía suplementaria se obtiene si en la composición del pienso no entran proteínas de origen cerdo)
Otras especies animales	<ul style="list-style-type: none"> . La explotación debe estar cercada de manera que pueda impedirse la entrada de otros mamíferos. . Las porquerizas deben estar dotadas en puertas y ventanas de un sistema que impida la entrada a toda clase de animales. . El vagabundeo de animales domésticos debe estar <u>pro</u>hibido en el interior de la explotación.
Utensilios destinados a las cochiqueras	<ul style="list-style-type: none"> . Desinfección antes de introducirlos definitivamente en los locales.
Transportes	<ul style="list-style-type: none"> . Limitarlos al mínimo indispensable. . Desinfección de los vehículos . Descargarlos en áreas alejadas de los animales.

Embalajes

- . No poner nunca el embalaje de origen en contacto con los animales.
 - . Si es posible hacerse librar con doble embalaje, eliminando el exterior antes de introducirlo a la finca.
-

Personas:

Personal de la finca

- . No debe tener, al exterior de la finca, ningún contacto con otros cerdos.
-

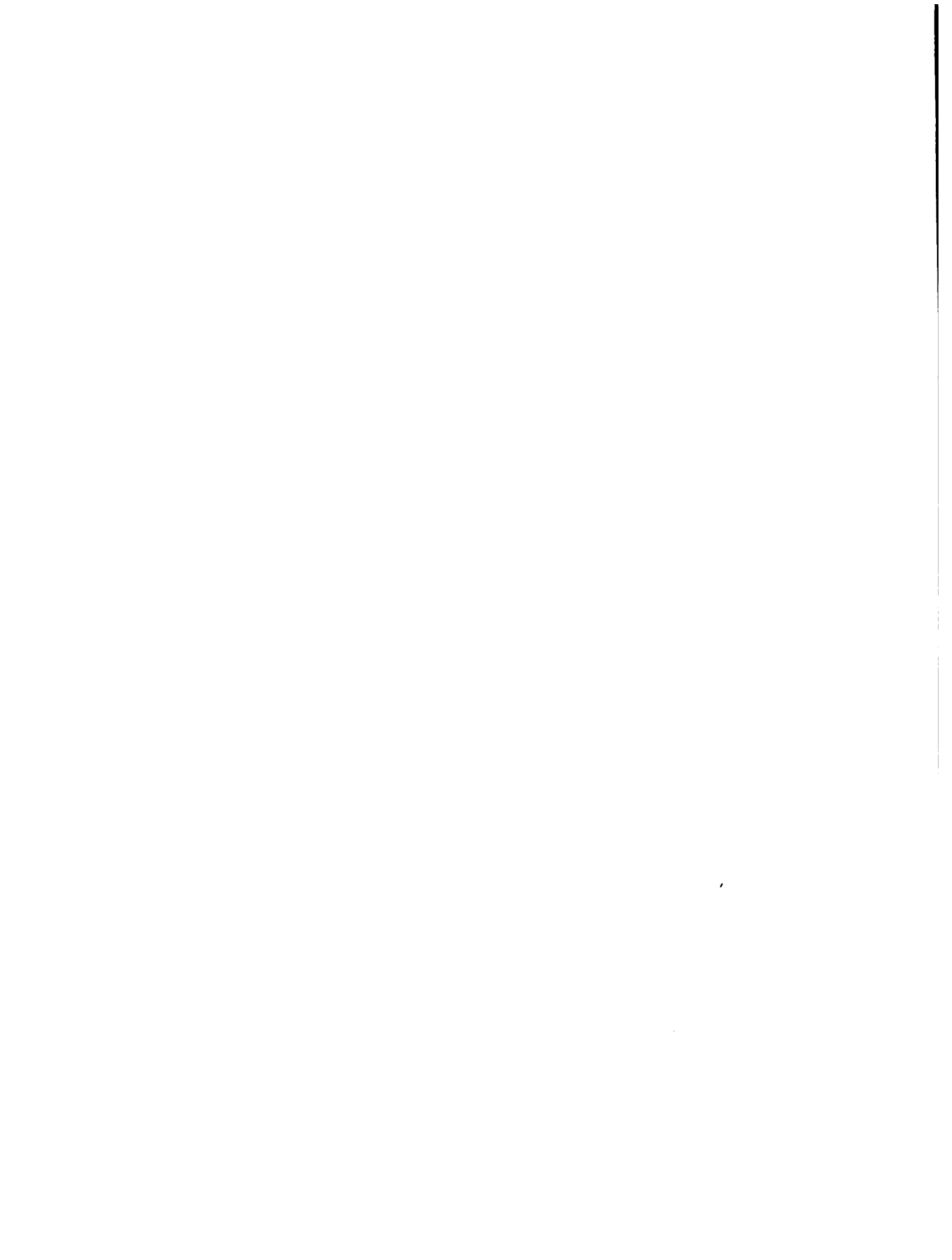
Representantes de Comercio.

- . Sin acceso a los animales.
-

Compradores

- . Desinfección del calzado.
 - . Acceso a los animales cubiertos por un guardapolvo, expresamente destinado a esta finalidad por el propietario.
-
-

A N E X O S

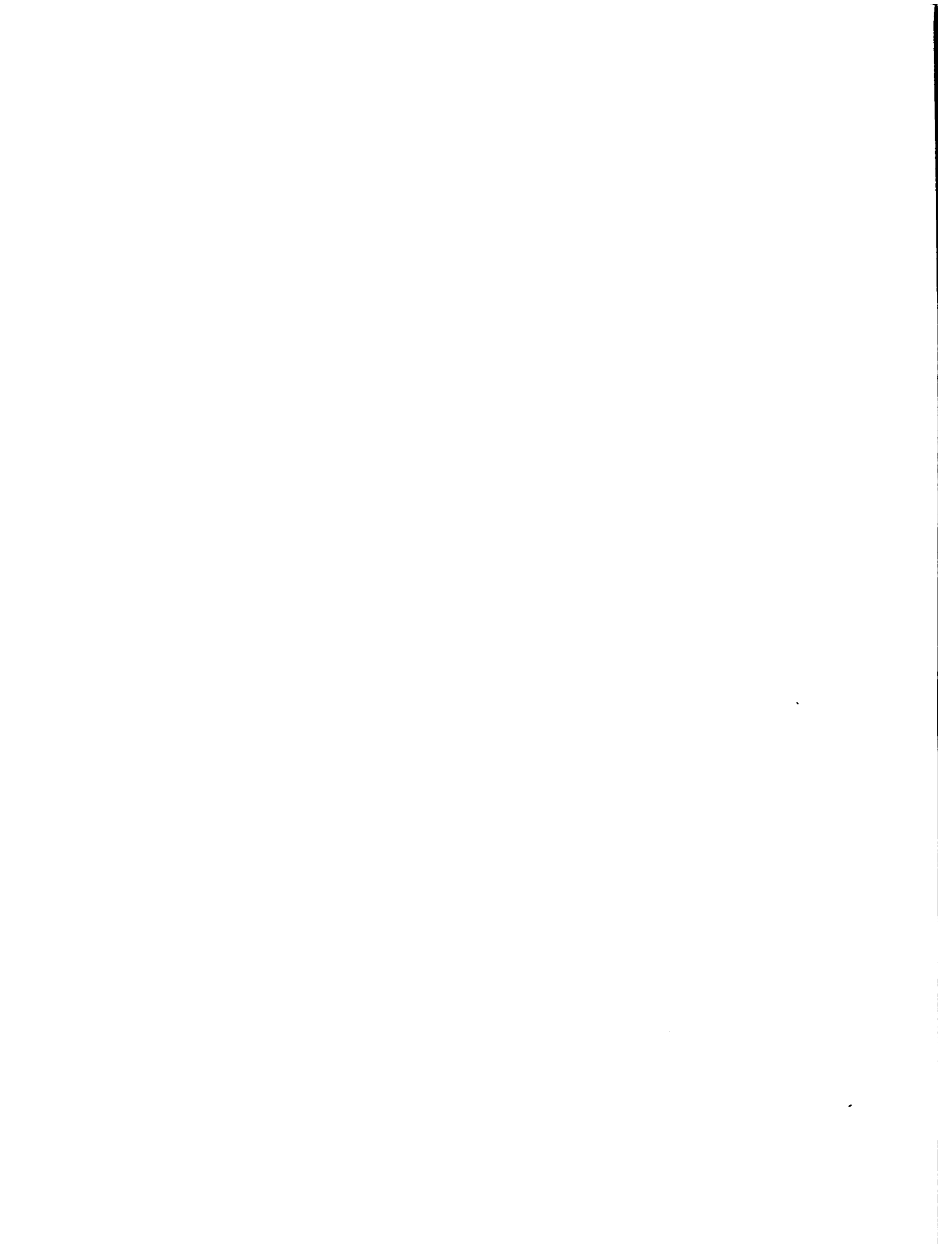


ANEXO I

Cultivo de Tejidos.

Elementos de base :

- 1- Composición de las principales soluciones tamponadas.
- 2- PBS.
- 3- Hank's
- 4- Earle
- 5- Solución de Rojo de Fenol
- 6- Antibióticos y fungicidas
- 7- Medio de cultivo MEN.
- 8- Medio de cultivo de Leucocitos de cerdo.
- 9- Solución de Cristal-Violeta
- 10- Solución de Tripsina-Versene
- 11- Cámaras de recuento celular
- 12- Conservación de células de Nitrogeno Líquido.
- 13- Solución Alsever.



CULTIVO DE TEJIDOS

El cultivo de tejidos es la base de la independencia del diagnóstico de las enfermedades virales en general y de la P.P.A. en particular.

Es necesario que cada país disponga de una estructura capaz de realizarlo cotidianamente, en dependencias del Ministerio de Agricultura y a cargo de profesionales veterinarios, que reúnan la doble ventaja de los conocimientos técnicos y de su formación fisio-patológica, que son indispensables para la interpretación de los resultados.

El cultivo de tejidos está dividido en tres anexos:

- 1- En el primero se describen las soluciones y medios de cultivo necesarios para su preparación.
- 2- En el segundo las técnicas apropiadas para realizar los cultivos mencionados en la monografía.
- 3- En el tercero, las técnicas de observación y las coloraciones más empleadas.

I 1Composición de las principales Soluciones Salinas Tamponadas

	PBS	HANK'S	EARLE
ClNa	8'00	8'00	6'8
ClK	0'20	0'40	0'40
* Cl ₂ Ca			
{ anhidro	0'10	0'14	0'20
{ 2 H ₂ O	0'13	0'19	0'27
Cl ₂ Mg (6 H ₂ O)	0'10	0'10	----
* PO ₄ HNa ₂			
{ 2 H ₂ O	1'15	0'06	----
{ 12 H ₂ O	2'30	0'12	---
PO ₄ H ₂ Na	----	----	0'125
SO ₄ Mg (7 H ₂ O)	----	0'10	0'20
PO ₄ H ₂ K	0'20	0'06	----
Glucosa	----	1'00	1'00
CO ₃ Hna	----	0'35	2'20

* Según el producto disponible.

La concentración está indicada en gramos por litro.

La preparación de cada una de estas soluciones se detalla en las páginas siguientes.

I 2

P. B. S.

Phosphate Buffered Saline.

Preparar en el orden indicado las soluciones madres siguientes:

A-	ClNa	8'00	grs.
	ClK	0'2	"
	PO ₄ HNa ₂ 2 H ₂ O	1'15	"
	PO ₄ H ₂ K	0'20	"
	Agua	200	cc.
B-	Cl ₂ Ca Anhidro	0'1	gr
	Cl ₂ Mg (6 H ₂ O)	0'1	"
	Agua	200	cc.

En autoclave las dos soluciones se esterilizarán por separado.

De no ser así, mezclar y esterilizar por filtración.

Se puede preparar diez veces concentrado.

Conservación a 4°C.

I 3

Solución de HANK'S

Preparar en el orden indicado, las soluciones madres siguientes:

A-	ClNa	100 Grs
	ClK	5 "
	SO ₄ Mg (7 H ₂ O).....	2-5 "
	Agua	500 cc.
B-	PO ₄ HNa ₂ (2 H ₂ O)	0'75 grs.
	PO ₄ H ₂ K	0'75 "
	Agua	500 cc.
C-	Cl ₂ Ca	1'75 grs.
	Aguas	200 cc.
D-	Glucosa	20 grs.
	Agua	100 cc.
E-	NaHCO ₃	1'4 grs.
	Agua	100 cc.

Mezclar estas soluciones en las proporciones siguientes:

Solución	A	40 cc.
"	B	40 "
"	C	20 "
"	D	5 "
"	E	22 "
"	de Rojo Fenol a 1%;	1'6 cc.

Completar con agua hasta un litro y esterilizar por filtración. Conservación a 4°C.

En caso de conservación prolongada, la solución E se añadirá solamente en el momento del empleo.

Se puede preparar diez veces concentrado.

I 4

Solución de FARLE

Preparar las soluciones siguientes:

A-	ClNa	6'8	grs.
	ClK	0'4	"
	PO ₄ H ₂ Na (2 H ₂ O)	0'14	"
	Glucosa	1'0	"
B-	Cl ₂ Ca	0'2	"
	Cl ₂ Mg (6 H ₂ O)	0'17	"
	Disolver en 60 cc. de agua.		

Mezclar A y B, completar a 1000 cc. de agua, esterilizar por filtración.

Añadir 100 cc. de agua conteniendo 2'2 gramos de bicarbonato, previamente esterilizado al autoclave.

I 5

Solución de Rojo de Fenol

Se añade a los medios de cultivo como indicador de pH.

A pH = 7 , da un color rojo anaranjado.

A pH ácido, amarillo-naranja.

A ph alcalino, rojo violeta.

Preparación:

Se usará la solución a 1% preparada de la siguiente forma:

Rojo de Fenol (soluble en alcohol) 1 gr.

Sosa Normal, en cantidad suficiente para disolverlo
que debe ser inferior a 7 cc.

Agua 100cc.

Disolver el colorante en la sosa con la ayuda de un mortero.

Esterilizar en autoclave.

De forma general se añade 1'6 cc. del colorante así preparado, litro por medio.

I 6

Antibióticos y fungicidas más empleados en el cultivo celular.

Antibiótico	Solución a preparar	Cantidad a añadir al medio	Concentración en el medio
Penicilina G. Sódica	100.000 U./1 cc.	1cc./ litro	100 U./cc.
Sulfato de Estreptomicina	100.000 µg/1 cc.	1 cc./litro	100 µg/cc.
Aureomicina	10.000 µg/1 cc.	5 cc./litro	50 µg/cc.
Kanamicina	50.000 µg/1 cc.	1 cc./litro	50 µg/cc.
Cloramfenicol	10.000 µg/1 cc.	1 cc./litro	10 µg/cc.
Tetraciclina	10.000 µg/1 cc.	1 cc./litro	10 µg/cc.
Bacitrina	10.000 µg/1 cc.	1 cc./litro	10 µg/cc.
Colimicina	500.000 µg/1 cc.	1 cc./ litro	500 µg/cc.
<u>Fungicidas</u>			
Fungizona			
(Amphotericina B.)	5.000 µg/1 cc.	1 cc./litro	5 µg/cc.
*Micostatina			
(Nistatina)	50.000 U/ cc.	0'5 cc./litro	25 U /cc.

* La Nistatina es poco soluble en agua, por lo que se emplea bajo la forma de suspensión que es necesario agitar fuertemente antes de usarse.

La fórmula de antibiótico más frecuentemente usada en cultivo de tejidos tiene la preparación siguiente:

Penicilina G. Sódica	2.000.000 U.
Sulfato de Estreptomicina	1 gr.

Solución de Hank's o de P.B.S. 50 cc.

Agitar hasta dilolver.

Repartir en ampollas de 1 a 5 cc.

Conservar a 20°C.

Una vez congeladas, su validez es de tres días.

Para su uso añadir 0'5 cc. por 100 cc. de medio, con lo que se logra una concentración final de antibióticos de 200 U. de penicilina y 100 ug. de estreptomina.

I 7

M. E. M.

(Eagle's Minimum Essential Medium)

Es el medio de cultivo más corrientemente empleado en el cultivo de toda clase de células. Su preparación es suficientemente compleja para preferir los preparados comerciales; sin embargo mencionaremos su composición de manera a poder suplementar este medio, si un determinado tipo de células lo necesita.

* Solución salina de Earle (o de Hank's) 1 litro.

* Aminoácido : (grs./litro)

Arginina	0'126	Leucina	0'0524
Cistina	0'024	Lisina	0'073
Tirosina	0'036	Methionina	0'015
Cistidina	0'042	Fenil Alanina	0'033
Glutamina	0'292	Treonina	0'046
Iso-Leucina	0'0525	Triptofano	0'010
		Valina	0'047

* Vitaminas:(grs./litro)

Cloruro de Colina	0'001	Pantotenato cálcico.....	0'001
Acido Fólico	0'001	Piridoxal	0'001
Inositol	0'002	Riboflavina	0'0001
Nicotinamida	0'001	Thiamina	0'001

I 8

Medio de Cultivo para Leucocitos de Cerdo.

Habitualmente está formado por dos componentes:

Solución Salina Fosfatada.

Suero de Cerdo.

Solución Salina Fosfatada.

Como solución salina fosfatada, se emplea indiferentemente las soluciones de Hank's o de Farle.

Suero de Cerdo.

Todos los sueros son susceptibles de utilización para la preparación del medio, pero se ha observado que el suero de cerdo donador de los leucocitos es más favorable para el desarrollo del cultivo, y evita por la misma ocasión, los fenómenos de hemoaglutinación de hematies, que con carácter raro, pueden presentarse en caso de emplear un suero de un cerdo perteneciente a un grupo sanguíneo diferente.

Para ello:

- Si se emplea la técnica de sedimentación espontánea (Francia).

El tubo de centrífuga, que se llenó de sangre sin anticoagulante en el momento de la sangría, se deja en reposo durante el tiempo necesario a las manipulaciones del aislamiento de los leucocitos.

En este intervalo, la sangre coagula, y al final de las operaciones el tubo se centrifuga a 2000 r. p. m., durante 20 minutos para separar el sedimento (coagulo) del sobrenadante (suero).

El sobrenadante se recoge en la pipeta y se mezcla en proporción variable a la solución salina empleada.

- Si se emplea el cultivo a partir de la médula ósea (Portugal).

El cerdo es sangrado completamente y la sangre recogida estérilmente.

La sangre coagula espontáneamente y el suero es recogido después de una centrifugación y añadido a la solución salina en proporciones variables.

En general, los límites de la proporción de suero a añadir a la solución salina, oscilan entre 20 y 100 por ciento. Efectivamente, los leucocitos pueden cultivarse en presencia de suero de cerdo puro, pero en la práctica la cantidad utilizada oscila alrededor de 50 por ciento.

Los leucocitos- siendo muy sensibles a la acción de los antibióticos, su proporción en el medio final será de :

Penicilina 100 U y Estreptomina 100 u grs.

I 9

Solución de Cristal Violeta

La solución de Cristal Violeta se emplea frecuentemente como medio de disolución en los recuentos de células nucleadas.

Reactivos.-

Disolver por orden en 100cc. de agua desionizada:

2'1 Grs. de Acido Cítrico

0'1 grs. del colorante Cristal Violeta.

Agitar hasta disolver.

Técnica.- En el momento del recuento mezclar 0'4 cc. de suspensión celular, con 0'1 cc. de la solución colorante. Mezclar bien.

Interpretación.- Las células vivas toman el colorante, que se manifiesta por una coloración violeta en el núcleo que se ve rodeado de un citoplasma claro.

Solamente se contarán este tipo de células en el momento del recuento.

I 10

Solución de Tripsina-Versene

Empleada para realizar los pases de los tapices de las líneas celulares.

Preparar en el orden indicado, las soluciones madres siguientes:

A-	ClNa	8'00	Grs.
	ClK	0'40	"
	PO ₄ HNa ₂(12 H ₂ O)....	0'12	"
	PO ₄ H ₂ K	0'06	"
	Glucosa	1'00	"
	Tripsina 1/250	2'50	"
	Versene	0'20	"
	Agua	800	cc.
B-	CO ₃ HNa	1'4	Grs.
	Agua	100	cc.

Añadir 72 cc. de B a A.

Medir el pH, y dejarle a 7'3-7'5, por adición de unas gotas de B.

Completar hasta un litro de agua.

Esterilizar por filtración

Congelar a 20°C.

Cámaras de Recuento Celular.

Las dos más frecuentemente empleadas son:

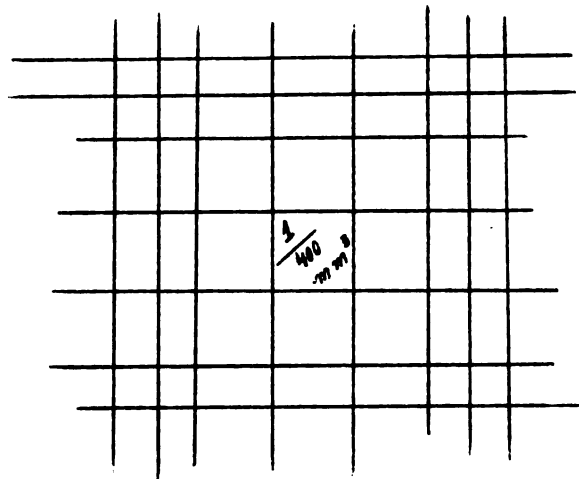
- Cámara de Thoma.

Está formada por un cuadrado de 1mm de lado. Cada lado está dividido en 20 partes iguales por rayas, cuyo cruzamiento determina 400 cuadros. La superficie de cada quinto cuadro está dividida por una raya suplementaria al objeto de facilitar la lectura.

Cada uno de los 400 cuadros tiene $1/20$ mm de lado, lo que representa una superficie de $1/400$ mm², que multiplicada por $1/10$ de altura nos dá un volúmen por cuadro de $1/4000$ mm³.

La solución madre del cultivo a valorar se puede diluir antes de introducir la en la cámara, y un cierto número de cuadros es objeto de lectura, la cantidad total de células por mm³ de la suspensión madre se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Células} = \frac{\text{Cantidad de células contadas} \times \text{Dilución realizada} \times 4000}{\text{Cantidad de cuadros contados.}}$$

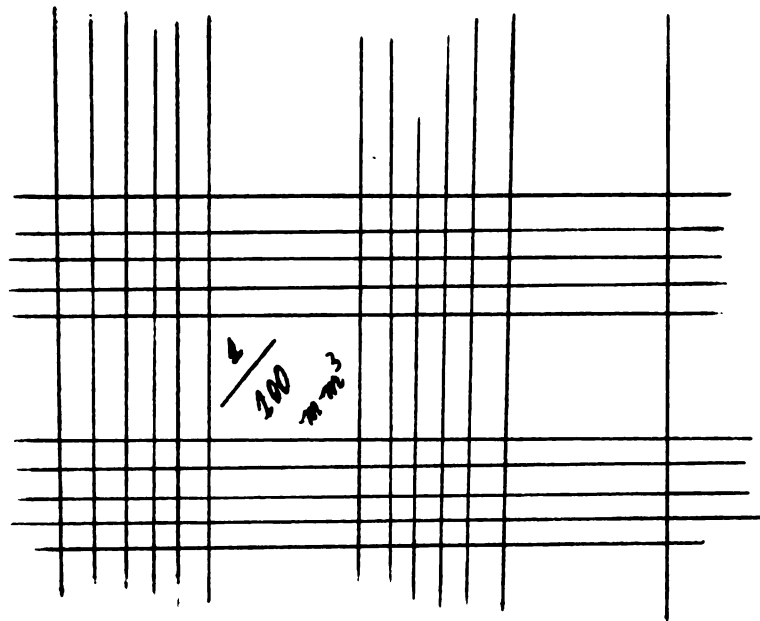


THOMA

- Cámara de Malassez.

El cruce de las rayas determina 100 rectángulos de una superficie de $1/20 \text{ mm}^2$, a los que una altura de $1/5 \text{ mm}$ confieren un volúmen de $1/100 \text{ mm}^3$.

El total de células contadas en los 100 cuadros equivale al total de células existentes en un milímetro cúbico, y no queda más que multiplicar esta cifra por la dilución para obtener la cantidad de células existentes en un mm^3 de la suspensión madre.



MALASSEZ

I 12

Conservación de Células en Nitrogeno Líquido -170°C.

Reactivos. Dimetil sulfo-oxide

Técnica de congelación:

Tripsinar el tapiz celular.

Lavar abundantemente las células resultantes.

Preparar el medio de congelación.

Medio de cultivo con 10% de dimetil sulfo-óxido esterilizado por filtración.

Suspender 2.000.000 de células por cc. de este medio.

Repartir en ampollas de congelación a razón de 1 cc. por ampolla.

Pasar las ampollas a 4°C durante cuatro horas.

Pasar las ampollas a 30°C durante treinta minutos.

Inmerger las ampollas en el nitrógeno líquido.

Técnica de descongelación:

Descongelar la ampolla rápidamente por inmersión en el banomaria a 37°C.

Pasar el contenido de la ampolla a un frasco de cultivo de 60 cc. (30 cm² de superficie de cultivo).

Completar con el medio de cultivo habitual hasta 8 cc.

Cambiar el medio a uno y tres días.

Tapiz completo, generalmente en 7 días.

I 13

Solución conservadora de Hematies.

Solución de ALSEVER.

Composición:

Glucosa	2'05	Grs.
Citrato Trisódico (2 H ₂ O)	0'8	"
Cloruro Sódico	0'42	"
Acido Cítrico	0'055	"
Agua destilada	100	cc.

Esterilización por filtración.

Técnica a emplear para la conservación de hematies.

Se mezcla a partes iguales la solución de Alsever y la sangre desfibrinada.
Agitar suavemente y conservar a 4°

En el momento de utilizar los hematies:

- Centrifugar a 1000 r.p.m. durante 10 minutos para eliminar la solución.
- Lavar varias veces en el medio de cultivo a emplear.
- Realizar una suspensión final de hematies de 1-2%.

ANEXO II

Cultivo de Tejidos.

Técnicas de Cultivo:

- 1- Cultivo de la Línea PK 15
- 2- Cultivo de la Línea VERO
- 3- Cultivo de Leucocitos de Cerdo
- 4- A partir de sangre: Por Sedimentación
- 5- A partir de sangre: Por desfibrinación
- 6- A partir de Médula Osea.

II 1

Cultivo de la línea de riñon de cerdo P.K. 15

Reactivos:

Solución de Tripsina Versene

Medio de cultivo. Earle + 0'5% de lactoalbumina + 10% de suero de ternera.

M.E.M. + 10% de suero de ternera.

Técnica de Cultivo:

A partir del tapiz de un frasco de 250 cc.

Lavar el tapiz celular 2 o 3 veces con PBS. (sin Ca ni Mg)

Añadir 5 cc. de la solución de tripsina Versene y dejar actuar de 10 a 20 minutos.

Una vez el tapiz separado del vidrio y las células aisladas, neutralizar la acción de la Tripsina Versene, añadiendo 0'5 cc. de suero de ternera.

Centrifugar a 1000 r.p.m. durante 10 minutos.

Remover el sedimento y suspenderlo en el medio de cultivo.

Coefficiente de multiplicación:

Tres veces la superficie inicial.

Formación de una tapiz confluyente:

Tres días.

Ritmo de tripsinaciones:

Dos veces por semana, para la conservación de la línea.

II 2

Cultivo de la Línea de Riñón de Mono VERO

Reactivos:

Solución de Tripsina -Versene

Medio de Cultivo MEN + 5% de suero fetal de ternera.

Técnica:

A partir de un frasco de cultivo de 250 cc.

Lavar la capa con una solución salina tamponada.

Lavar la capa celular con 5 cc. de tripsina-versene.

Dejar actuar 2 minutos, 5 cc. de tripsina versene.

Tirar el sobrenadante, dejando solamente sobre el tapíz unas gotas de la solución.

Dejar actuar 5 minutos a 37°

Remover la capa celular con la pipeta y resuspender las células en el medio de cultivo.

Coeficiente de multiplicación:

Cuatro veces la superficie inicial.

Formación de una capa celular confluyente:

Tres días.

Ritmo de tripsinación:

Una vez por semana, para la conservación de la línea.

II 3

Cultivo de Leucocitos de Cerdo.

El cultivo de leucocitos, base del diagnóstico de la P.P.A., por aislamiento e identificación viral, tiene caracteres propios que la diferencian de los cultivos de tejidos clásicos.

Es un cultivo en el que las células (Monocitos y linfocitos) se transforman sin multiplicarse.

La transformación se visualiza por un aumento de la superficie celular y por una inversión del coeficiente núcleo/citoplasma.

La ausencia de multiplicación se constata por la falta de mitosis en el cultivo, lo que hace que el cultivo se presente como un conjunto de células aisladas y no formando una capa confluyente al que nos tienen acostumbrados los cultivos de tejidos clásicos.

La transformación y supervivencia de estas células es óptima en presencia de un medio compuesto de 100% de suero de cerdo, aceptable a 50% es solución de Hank's, y siendo la concentración mínima indispensable de 20% de suero en esta solución; cifras muy superiores al 10 - 12 % de suero a añadir al medio de los cultivos clásicos.

La transformación se realiza de 48 a 72 horas de cultivo y la vida media de éste es de 12 a 14 días, sin necesidad de cambiar de medio de cultivo, lo que deja como días utilizables para la inoculación los comprendidos entre 3 y 6 post incubación, lo que permite ocho días de observación necesaria para los casos negativos.

Todo laboratorio que se ocupe de virología porcina, debe conocer su preparación pues este cultivo permite la multiplicación de los virus reponsables de las tres virosis más importantes de la patología porcina: PPA. con HAD Y ECP; Aujeszky: con ECP. PPC. sin manifestaciones aparentes.

II 4

CULTIVO DE LEUCOCITOS

Técnica de Sedimentación Espontánea (Francia)

Material:

Cerdo de 20 a 40 kilos, raza y sexo indiferente.

Agujas hipodérmicas de 1'5/150 (calibre interno/longitud en mm.)

Jeringa de 30-50 cc.

Tubo de centrífuga de 250 cc. de capacidad

Tubos de sedimentación 20/200

Centrífuga

Tubos de cultivo 16/160

Cámara para recuento celular.

Anticoagulante - Heparina (sin conservador) dosificada a 5000 U.I. por cc.

Edta (Versene) solución de 200 miligramos por 10 cc. de agua.

Medio de cultivo.

Método:

Sangrar el cerdo con la aguja hipodérmica, en la vena cava anterior o en la confluencia del golfo de las yugulares para recoger: 30-50 cc. de sangre en la jeringa, en la precedente hemos introducido el anticoagulante (heparina o versene) en la proporción de un cc. por cada 10 cc. de sangre a recoger.

- 200 cc. de sangre, sin adición de anticoagulante sobre el tubo de centrifugación (1).

Pasar la sangre con anticoagulante de la jeringa al tubo de sedimentación (20 cc. por tubo), llevar el tubo a la estufa a 37°C donde se le dejará en reposo, con una inclinación de 45°

1- Los 200 cc. de sangre completa contenidos en el tubo de centrífuga, van a servir a la preparación del medio de cultivo.

. Medir el límite de la sedimentación de los hematies cada cinco minutos y construir un gráfico anotando la sedimentación en mm. sobre el eje de ordenadas, y el tiempo en fracciones de cinco minutos sobre el eje de abscisas.

. Sobre el gráfico así construído, podemos ver que la sedimentación se realiza de forma regular durante varios minutos y que a un momento dado la curva manifiesta una inflexión. En este momento se recoge el sobrenadante de la sedimentación, que está formado por una fase líquida el plasma con anticoagulante, y células en suspensión: Leucocitos, plaquetas y algunos hematies.

- . Centrifugar a 3000 revoluciones por minuto, durante 10 minutos.
- . Tirar el sobrenadante (plasma y plaquetas)
- . Resuspender el sedimento en la solución de Hank's (o de Earle) y volver a centrifugar eliminando de nuevo el sobrenadante.
- . Repetir esta operación dos o tres veces.
- . Resuspender el sedimento en una cantidad arbitraria de medio de cultivo y proceder al recuento celular.

. Completar con medio de cultivo hasta obtener una suspensión celular final de $2 - 5 \times 10^6$ (dos a cinco millones de leucocitos) por cc. de medio de cultivo (2)

. Repartir en tubos de virología, agitando constantemente, a razón de 2 cc. por tubo.

- . Llevar los tubos a la estufa a 37°C , y dejarlos en reposo.
- . Observarlos diariamente hasta la transformación.

2- En la práctica, a partir de 50 cc. de sangre con anticoagulante se obtienen 200 cc. de suspensión celular, suficientes para una serie de cultivo de 100 tubos.

II 5

CULTIVO DE LEUCOCITOS

Técnica de Desfibrinación (España)

Material:

Cerdo de 60-100 Kilos

Mesa de contención

Agujas hipodérmicas de 1'5/150 (calibre interior por longitud en mm.)

Tubo de goma de transfusión sanguínea.

Aparato de transfusión sanguínea.

Aparato de desfibrinación mecánica,

Tubos de centrífuga de 250 cc. de capacidad.

Centrífuga.

Tubos de cultivo 16/160 mm.

Cámara de recuento celular.

Solución de Hank's o de Earle.

Método:

. Tomar de la vena cava anterior, o del golfo de yugulares, 1000 cc. de sangre a través de un aparato de transfusión y depositarla en el desfibrinador mecánico.

. Accionar las palas del desfibrinador hasta completar esta acción.

. Pasar la fase líquida, a través del aparato de transfusión, sobre los tubos de centrífuga.

. Centrifugar a 2500 r.p.m. durante 20 minutos.

. Tres zonas se diferencian: Superior, líquida, formada por el suero.

Media, sólida, grisácea, compuesta por los leucocitos.

Inferior, sólida, roja, compuesta por los hematies.

- . Recoger el suero para la formación del medio de cultivo.
- . Con una pipeta, aspirar la capa gris, recogiendo al mismo tiempo una pequeña cantidad de hematies, necesarios para el test de HAD.
- . Calcular los leucocitos así obtenidos, suspenderlos en el medio de cultivo a razón de $4-6 \times 10^6$ por cc.
- . Repartir en agitación permanente , a razón de 2 cc. por tubo de cultivo.

Esta técnica presenta la ventaja de proporcionar una gran cantidad de tubos que se obtienen en circuito cerrado, al abrigo del aire, lo que evita las contaminaciones por manipulación.

II 6

CULTIVO DE LEUCOCITOS

A partir de la Médula Osea (Portugal)

Material:

Cerdo de 7 a 30 días.
Tubos de centrifugación
Material de disección
Solución de Hank's o de Earle
Filtros de gasa estéril
Centrífuga
Tubos de cultivo.
Cámara de recuento celular.

Método:

- . Dejar el cerdo en ayunas durante 24 horas.
- . Sangría exhaustiva en la que se recoge estérilmente la sangre para la preparación del medio de cultivo.
- . Realizar la disección para aislar los huesos largos.
- . Cortar y retirar estérilmente, la parte ósea de las epifisis.
- . Retirar mecánicamente la médula roja, sirviéndose de un bisturí o cucharilla cortante.
- . Cortar la médula roja, aislarla, cortar trozos pequeños y suspenderlos en solución de Hank's o de Earle, agitando fuertemente para liberar las células del tejido de soporte.
- . Filtrar a través de la gasa estéril.
- . Centrifugar a 2000 r.p.m. durante 10 minutos
- . Tirar el sobrenadante.
- . Suspender el sedimento de centrifugación en el medio de cultivo.

- . Realizar un recuento celular y ajustar la suspensión a 3×10^6 células por cc. de medio de cultivo.
- . Repartir en agitación constante en los tubos de cultivo a razón de 2 cc. por tubo.
- . Llevar a la estufa a 37°C y dejar en reposo.
- . Observación diaria hasta la transformación.

ANEXO III

Cultivo de Tejidos

Coloración, observación:

- 1- Coloración de Giemsa
- 2- Coloración de Feulgen
- 3- Coloración de Acridina - Orange
- 4- Inmuno-Fluorescencia
- 5- Preparación de Suero immune P.P.A.
- 6- Extracción de IgG del Suero
- 7- Conjugación al iso-tio-cianato de fluoresceína
- 8- Glicerina Tamponada
- 9- Microscopio de luz Ultravioleta
- 10- Luz transmitida
- 11- Esquema
- 12- Luz reflejada
- 13- Esquema

III 1

COLORACION DE GIMSA

Reactivos: Colorante de Giemsa

Giemsa en polvo	0'75	Crs.
Metanol puro	75	cc.
Glicerina Pura	25	cc.

Técnica de coloración:

Secar la preparación a la corriente de aire templado.

Fijar con alcohol metílico 10 minutos.

Secar la preparación a la corriente de aire templado.

Dejar actuar el colorante, preparado en el momento de su uso por mezcla de 1-2 gotas de colorante por cc. de agua, 30 minutos.

Lavar con agua del grifo.

Secar.

Montar.

Resultado:

Los núcleos de las células aparecen de color rojizo, los citoplasmas azulados.

III 2

COLORACION DE FEULGEN

* Acido Osmico: Atención a sus vapores, pues es un tóxico violento.

* Acido Clorhídrico, normal.

82'5 cc. de ácido puro de 1'29°de densidad

1000 cc. de agua.

* Reactivo de Schiff.

Fuchsin diamante Geygy 1 Gr.

Agua200 cc.

Disolver en caliente, enfriar y añadir:

Bisulfato de Sodio en solución a 30%.. 3 cc.

Dejar reposar durante una hora y añadir:

Acido clorhídrico N 20 cc.

El reactivo así preparado se decolora en menos de 24 horas, adoptando un color amarillo pálido, si conserva una coloración rojiza o rosácea debe eliminar se.

Conservación a 4°C, bien tapado.

*Solución Sulfurada.

Bisulfito de sodio (líquido comercial).. 10 cc.

Acido clorhídrico N. 10 cc.

Agua200 cc.

Técnica de coloración:

Fijación en vapores de ácido ósmico a 2%, 30 segundos

(en caso de dificultad fijar con Carnoy, 20 minutos)

Reposo de 24 horas en alcohol etílico a 95°

Hidrolisis en dos tiempos

a- Acción del Ac. clorhídrico N. a 25°C durante un minuto

b- Acción del Ac. clorhídrico a 60°C, durante quince minutos.

Parar el proceso de hidrolisis por inmersión en agua a 4°C
Dejar actuar el reactivo de Schiff durante 1 hora 30 minutos.
Decolorar por la acción de tres baños sucesivos, cada uno de 10 minutos en la solución sulfurada, preparada en el momento de utilización.

Lavado abundante en agua corriente.

Secar y montar.

Resultado:

Los depósitos de ADN cromáticos o virales aparecen coloreados en rojo-violeta (Feulgen positivos).

III 3

COLORACION POR ACRIDINA ORANGE.

Reactivos:

Fijador de Carnoy	Acido acético glacial	100 cc.
	Alcohol etílico	50 cc.

Solución citrato tamponada a pH = 4'2

Acido citrico	5'25 Grs.
PO ₄ HNa ₂ (12 H ₂ O)	10'00 "
Agua	500 cc

Solución colorante

Orange de acridina	0'05 Grs.
Agua	50 cc.

Técnica de coloración:

Fijar con Carnoy 10 minutos
 Lavar tres veces con la solución citrato
 Dejar actuar la solución colorante 5 minutos
 La solución colorante se diluye en el momento de emplearla de la siguiente forma:
 Solución colorante 1 cc.
 Solución Citrato 9 cc.
 Lavar tres veces con la solución citrato.
 Montar la preparación en la misma solución.

Resultado:

Los núcleos y otros depósitos de ADN presentan una fluorescencia amarilla y el ARN. presenta una fluorescencia roja, cuando las preparaciones se observan al microscopio de fluorescencia.

III 4

IMMUNO FLUORESCENCIA.

Es la técnica complementaria de la hemoadsorción en el diagnóstico viral y la técnica de referencia en el serológico.

De alto valor específico, aporta la sensibilidad necesaria que hace de ella la técnica de referencia en serología.

Su interpretación es unívoca, puesto que la fluorescencia se localiza en el viroplasma consecutivo a la multiplicación viral en el citoplasma celular.

Es evidente que necesita un microscopio de luz ultravioleta, pero el amplio espectro de aplicación de esta técnica hace que este microscopio forme parte del equipo de base de un laboratorio de virología moderno, ya que aplicando la técnica indirecta sobre el cultivo de tejidos- y con solamente un conjugado por especie animal, puede diagnosticarse una amplia gama de enfermedades virales, parasitarias o bacterianas.

Es, con la sero-neutralización en otras enfermedades, la técnica más fiable a emplear para la identificación viral y los estudios serológicos.

III 5

Preparación de Suero Immune P.P.A.

A partir de cerdos de 25 a 30 kilos.

De preferencia animales SPF. o al menos que no tengan anticuerpos contra las virosis más importantes del cerdo.

En razón del material virulento a inocular los animales se mantendrán en las condiciones más rigurosas de aislamiento.

De manera general se puede emplear el protocolo de inmunización siguiente:

D	:	Vía intramuscular;	5 cc. de virus modificado
D + 21	:	" "	5 cc. de virus patógeno
D + 51	:	Vía intraperitoneal;	250cc. de virus patógeno.
D + 81	:	Vía intraperitoneal;	250cc. de virus patógeno.
D + 100	:	Sangría-	

Es necesario que el virus modificado y el virus patógeno empleado, sean homólogos (aislados del mismo foco).-

III 6

EXTRACCION DE LA Y GLOBULINA A PARTIR DEL SUERO DE CERDO.

Material:

Suero de Cerdo

Agitador magnético

Centrífuga

Liofilizador

Tubo de dialisis

Solución saturada de sulfato de amonio:

- Disolver, aproximadamente 750 grs. de sulfato de amonio ($\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$) en 1000 cc. de agua desionizada.
- Mantener en agitación magnética 2 a 3 días.
- Dejar reposar para eliminar la sal no disuelta.
- Añadir al sobrenadante una solución de sosa normal (40 grs. por litro de agua), hasta obtener un PH de 7'0.

Solución fosfatada a PH=6'3 (0'0175 M.)

- Preparar las soluciones madres siguientes:

a- Fosfato potásico ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$) 2'38 grs.
 Agua desionizada 1000 cc.

b- Fosfato disódico (PO_4HNa_2) 2 H_2O 1'56 grs.
 Agua desionizada 500 cc.

Mezclar 773 cc. de la solución a, y 227 cc. de la solución b.

Tomar el PH: si es inferior a 6'3 añadir de la solución a.
 si es superior a 6'3 añadir de la solución b.
 Hasta ajustar bien el PH a 6'3.

Solución deci-normal de cloruro de bario.

Preparación de la columna de DCAF.-celulosa-

Lavar varias veces el polvo de DCAF.-celulosa en una solución de sosa semi-normal (20 grs. en un litro de agua)

Lavar con agua hasta obtener un sobrenadante limpio.

lavar con la solución fosfato $\text{PH}=6'3$, hasta que el sobrenadante llegue a este PH .

Tomar una columna de cromatografía de un cm. de diámetro, y depositar la DFAE-celulosa, a razón de una altura de 10 cm. por cada 5 cc. de suspensión a pasar.

Lavar una última vez la columna, así preparada, con la solución fosfato $\text{PH}=6'3$.

Conservar la columna, hasta el momento de su empleo a 4°C , con un exceso de solución fosfato en su parte superior.

Método:

Depositar 30 cc. de suero de cerdo a 4°C .- en un tubo de centrífuga de capacidad superior a 100 cc. provisto de una barra magnética.

Agitando lentamente, para evitar la producción de espuma, añadir gota a gota 30 cc. de la solución saturada de sulfato de amonio a 4°C .

Continuar la agitación 30 minutos.

Dejar en reposo toda la noche a 4°C . (mínimo cuatro horas)

Centrifugar 15 minutos a 3000 r.p.m.

Tirar el sobrenadante y disolver el precipitado en 3 cc. de agua.

Pasar a un tubo de dialisis y dializar frente a la solución fosfato $\text{PH}=6'3$.

Cambiar cada seis horas el líquido de dialisis, hasta que no queden trazas de sulfato de amonio (si al añadir unas gotas de cloruro de bario se forma una nube blanquecina es que aún queda amonio).

Centrifugar el contenido del tubo de dialisis durante 15 minutos a 2000 r.p.m.

Recuperar el sobrenadante y controlar su pureza por electroforesis o inmuno-electroforesis.

Si aún quedan albúminas, o una fuerte proporción de globulinas, completar con solución fosfato a 30 cc. y repetir la precipitación desde el principio,

hasta la purificación conveniente. O bien, pasar el sobrenadante por la columna DFAF-celulosa.

Eliminar el exceso de solución fosfato de la parte superior de la columna.

Depositar la solución dializada y centrifugada.

Depositar 50 cc. de solución fosfatada a PH=6'3 por cada 5 cc. de suspensión dializada.

Recoger el líquido de elución-

Una vez la purificación terminada, por uno de los dos sistemas anteriormente descritos, liofilizar el líquido obtenido y pesar el polvo resultante de la operación.

Este polvo está compuesto en su mayor parte, de Y Globulina Porcina.

Si hemos precipitado un suero normal de cerdo, podemos emplear las y globulinas para la inmunización de conejos, obteniendo así sobre este animal un suero anti-y globulinas porcinas. Este suero podrá ser a su vez precipitado y conjugado al isotiocianato de fluoreceína, obteniéndose así las globulinas conjugadas a emplear en la técnica I.F.I.

Si hemos precipitado un suero de cerdo anti P.P.A., conjugaremos directamente las y globulinas así obtenidas al ITCF. que serán empleadas en la técnica de IF. directa.

III 7

CONJUGACION DE Y GLOBULINAS AL ISO-TIO-CIANATO DE FLUORFCFINE

Material:

Agitador magnético.

Centrífuga.

Tubo de dialisis

Columna de Sephadex.

Preparar una columna de cromatografía, de un centímetro de diámetro, llenarla a tres cuartos de su altura con una suspensión de Sephadex G 50 grano fino, que ha sido lavada varias veces PH=7'2.

Lavar la columna así preparada, hasta que su salida arroje un PH=7'2.

Hasta el momento de su tulinización la columna puede guardarse a 4°C.

A todo lo largo de las manipulaciones necesariamente la parte superior del gel de sephadex estará bien cubierta de P.B.S.

Solución fisiológica.

8.5 grs. de cloruro de sodio en un litro de agua.

Solución carbonato-bicarbonata PH=9'5 0'5 M

Preparar las soluciones siguientes:

a- Carbonato sódico ($\text{CO}_3 \text{H Na}$) 2'1 grs.
 Agua 50 cc.

b- Bicarbonato sódico ($\text{CO}_3 \text{Na}_2$) 2'65 grs.
 Agua 50 cc.

Mezclar a y b, controlar el PH.

- si es inferior a 9'5 añadir un poco sol. de bicarbonato.

- si es superior a 9'5 añadir un poco sol. de carbonato

P.B.S. PH= 7'2

Isotiocianato de fluoresceína

Polvo de hígado de cerdo.

Cortar el hígado en pedazos finos y tritularlo.

Añadir cuatro veces su volúmen de acetona y agitar 30 minutos.

Centrifugar a 3000 r.p.m. durante 15 minutos.

Eliminar el sobrenadante de acetona.

Añadir cuatro veces el volúmen de sedimento de centrifugación, de solución fisiológica. Agitar.

Centrifugar a 3000 r.p.m. durante 15 minutos. Tirar el sobrenadante.

Repetir el lavado en solución salina, hasta que el sobrenadante no tenga trazas de hemoglobina.

Añadir cuatro veces el volúmen de la sedimentación de centrifugación de acetona.

Agitar, centrifugar.

Dejar secar a 37°C. Esta operación puede acelerarse si la realizamos debajo de una campana de vacío.

Pasar a un mortero y reducir a polvo.

Si no quedan trazas de grasa, conservar a 4°C.

Si quedan trazas de grasa, volver a empezar.

Método:

Pesar 30 miligramos de polvo de y globulinas.

Disolverlas en 2'5 cc. de solución fisiológica.

Pesar un miligramo de ITCF y disolverlo en 0'5 cc. de solución Carbonato-bicarbonato.

Mezclar y agitar las dos soluciones a 4°C. durante una noche. (mínimo cuatro horas)

Una vez se realice la conjugación, es necesario eliminar el exceso de fluorocromo para ello disponemos de dos procedimientos:

- a- Dialisis seguida de adsorción en polvo de hígado.
- b- Cromatografía en Sephadex.

a- Dialisis:

Pasar las globulinas a un tubo de dialisis.

Dializar frente a P.P.S., adicionado de una sustancia hidrofila (tipo Dowex o Carboxax)

Cambiar el agua de dialisis cada seis horas, hasta que no contenga trazas de fluoresceína.

Añadir al líquido dializado, cien miligramos de polvo de hígado de cerdo por cc.

Agitar 30 minutos de 4°C.

Centrifugar 2000 r.p.m. durante 15 minutos

Recoger el sobrenadante, añadir cien miligramos de polvo de hígado por cc. y repetir la operación, salvo que la centrifugación se hará a 10.000 r.p.m., durante 30 minutos.

Recoger el sobrenadante, distribuirlo en pequeñas fracciones (0'25 a 0'5 cc.)

Conservar a 30°C.

b- Cromatografía por Sephadex:

Añadir la mezcla globulina mas ITCF a la columna de Sephadex.

Una vez introducida en el gel, añadir PBS. de forma que la parte superior de la columna no esté nunca seca.

A medida que la filtración se realiza, veremos diferenciarse cuatro zonas, que de abajo a arriba son:

1- Zona Blanca, que corresponde al PBS de lavado.

2- Zona amarilla, que corresponde a las globulinas marcadas

3. Zona blanca que corresponde al PBS de lavado.
4. Zona en anillo amarillo, que corresponde al ITCF, no conjugado.

La salida de un ligero color amarillo por la extremidad de la columna nos indica el momento de empezar a recoger el líquido de filtración, el paso del color amarillo a incoloro, marcará el final de la recogida. Repartir el líquido así recogido en pequeñas fracciones. Conservar a 30°C.

Determinación de la dilución a utilizar:

Aplicar diferentes diluciones del conjugado así obtenido sobre células infectadas a objeto de determinar la máxima dilución compatible con la lectura correcta de la inclusión citoplásmica.

Las diluciones del conjugado se realizan en todos los casos en PBS.

Recordemos que las globulinas anti-cerdo, marcadas con el ITCF, se encuentran fácilmente en el comercio nacional o internacional, generalmente liofilizadas lo que asegura su conservación a precios interesantes.

III 8

GLICERINA TAMPONADA A pH 7'2

Para el montaje de preparaciones a observar por luz ultravioleta.

Preparar las soluciones siguientes:

a- Fosfato disódico (PO_4HNa_2)... 12 H₂O... 35'83 grs.
 Agua 100 cc.

Esta solución, por estar próxima a saturación se debe conservar a 37° C. Si cristaliza, se puede redissolver al baño María.

b- Fosfato monopotásico ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$) 13'62 grs.
 Agua 100 cc.

Mezclar:

Solución a 17'5 cc.
 Solución b 7'5 cc.
 Agua 475 '0 cc.
 Glicerina 500'0 cc.

Ajustar el pH entre 7'2 y 7'5 añadiendo la solución a si se revela más ácido, o solución b si revela más alcalino.

III 9

MICROSCOPIA DE LUZ ULTRAVIOLETA.

Generalidades:

Ciertas sustancias cuando reciben una luz ultravioleta, violeta o azul (luz de excitación), emiten una luz con una longitud de onda superior (luz de emisión).

Si la luz de emisión persisten una vez apagada la luz de excitación, la sustancia se llama fosforescente.

Si la luz de emisión desaparece al apagarse la de excitación recibe el nombre de fluorescente.

Entre otras sustancias de propiedades fluorescentes, se encuentran los llamados FLUOROCROMOS y entre estos los más utilizados son: El Orange de Acridina (OA.) y el Iso-Thio-Cianato de Fluoresceína (ITCF.)

El OA. se emplea en coloraciones directas sobre todo por su capacidad de teñir selectivamente el APV. de color rojo y el ADN de color amarillo.

El ITCF se emplea en immuno-fluorescencia, una vez conjugado a los anticuerpos, para revelar así la unión antígeno-anticuerpo cuando ésta tiene lugar.

En virología la manifestación de la fluorescencia o de la immuno-fluorescencia precisa un microscopio adecuado que recibe el nombre genérico de Microscopio de fluorescencia, o de luz ultravioleta.

Existen dos tipos principales de microscopios de fluorescencia:

En uno la luz atraviesa la preparación, en el otro la luz se refleja en la preparación. Luz transmitida y reflejada respectivamente.

En todos los casos la fuente luminosa es una lámpara de mercurio a alta presión de 50 o 200 W. (L). La lámpara está protegida por un portalámpara (PL) para evitar los riesgos consecutivos a su eventual explosión.

Su característica principal es la de emitir una luz muy viva y rica en rayos de pequeña longitud de onda (esta emisión puede producir quemaduras en la córnea en caso de mirarlas directamente o por reflexión de mosaicos, espejos o superficies metálicas).

La lámpara tiene una vida media de 200 horas, al cabo de las cuales continúa emitiendo luz, pero es menos rica en pequeñas ondas por lo que es inutilizable para la finalidad deseada.

III 10

MICROSCOPIO , POR TRANSMISION

En el que la luz de excitación atraviesa la preparación.

El rayo luminoso emitido por la lámpara, pasa a través de un porta-filtros (PF) en el que se colocará por orden:

Un filtro anticalorífico (FC), que absorbe los rayos infra-rojos, evitando así que el calor pueda dañar los otros filtros.

Un filtro de excitación (FE), que va a absorber la totalidad del espectro luminoso, salvo los rayos de pequeña longitud de onda (ultravioleta, violeta y azul), que son los rayos de excitación necesarios.

El filtro de excitación, más corrientemente empleado en virología, es el llamado BG.12 de 1'5 a 3 mm. de espesor. Este filtro selecciona una luz de excitación azul (400 nm) indicada para el TCF. Otros filtros, equivalentes, podrán ser empleados, a condición de seleccionar longitudes de ondas alrededor de 300 a 500 nm. Así el filtro interferencial 470 nm es de los mejores filtros, para este tipo de observaciones.

La luz de excitación (LEx), es dirigida hacia un condensador de fondo obscuro (C) que va a actuar de dos maneras:

- Haciendo converger los rayos luminosos, sobre la preparación.
- Desviando estos rayos, de manera que no entren directamente en el objetivo, lo que da a la preparación el fondo obscuro que contrastará con la luz emitida por el fluorocromo.

Hay dos tipos principales de condensadores en fondo obscuro:

- A inmersión, que precisa una gota de aceite de inmersión entre la lentilla del condensador y la parte inferior de la preparación, su apertura numérica es de 1'20

- A seco, muy práctico para el trabajo de diagnóstico que precisa de objetivos de mediano aumento (10, 25 o 40). Su apertura numérica es de 0'80.

Una vez concentrada sobre la preparación (P) la luz de excitación se dispersa sin entrar en el objetivo, después de haber iluminado el fluorocromo.

El fluorocromo iluminado emite una luz de una longitud de onda superior (LFm) que es recogida por el objetivo (Ob).

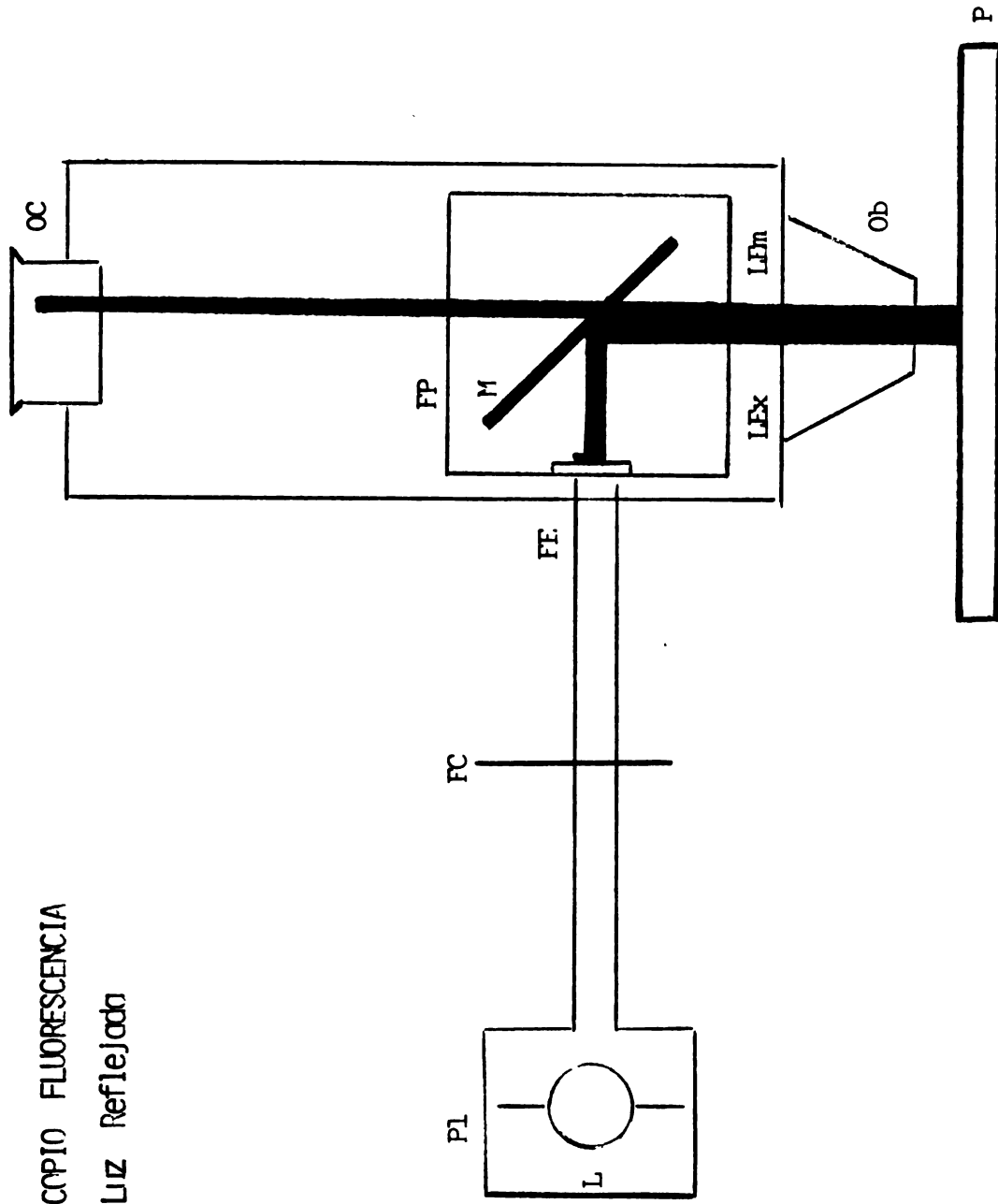
Los objetivos apocromáticos y acromáticos pueden ser utilizados, siendo los más frecuentemente empleados, en diagnóstico, los Planos Acromáticos.

Entre el objetivo y los oculares, la luz emitida atravesará un filtro llamado de parada (FP), este filtro tiene por misión eliminar los posibles restos de luz de excitación por lo que protege la córnea del observador y hace más profundo el fondo oscuro. Es un filtro de color amarillo, con un poder de absorción opuesto al del filtro de excitación, (si el filtro de excitación dejó pasar 470 nm, se debe emplear un filtro de parada de 470 nm).

Por último, la luz emitida y filtrada llega al ocular (Oc), que será de aumentos medio (x 8 ; x 10), pues un ocular más potente atenuaría la luz fluorescente, cuya intensidad es inversamente proporcional a los aumentos del ocular.

MICROSCOPIO FLUORESCENCIA

Luz Reflejada



- | | | | |
|--------------------|----------------------------|---------------|-----------------------------|
| L - Lámpara | LEEx - Luz Excitadora | Ob - Objetivo | P - Preparación |
| PL - Porta-Lámpara | FE - Filtro de Excitación. | OC - Ocular | PF - Porta Filtro |
| LEm - Luz Emitida | FP - Filtro de Parada | M - Espejo | FC - Filtro anti-calorífico |

III 12

MICROSCOPIO , POR REFLEXION.

En el que la luz de excitación se refleja en la preparación.

El rayo luminoso emitido por L, atraviesa el filtro anticalorífico FC, antes de penetrar en el tubo del microscopio donde encontrará un bloque en el que se localizan : El filtro de Excitación FE, un espejo selectivo (M) y el filtro de parada FP.

En este orden el rayo luminoso atraviesa primero el filtro de excitación que va a retener todo el espectro salvo las pequeñas ondas, transformándose así en luz de excitación.

A continuación la luz llega al espejo que reflejará solamente las ondas pequeñas, permitiendo el paso de las grandes. En estas condiciones la luz de excitación es reflejada hacia el objetivo.

El objetivo Ob. va a servir de condensador, por lo que le seleccionaremos entre aquellos de mayor apertura numérica. Después de atravesarle la luz de excitación LEx, llega a la preparación P, ilumina el fluorocromo y se transforma en luz emitida LEn, que es recogida por el objetivo y reenviada al espejo, que podrá atravesar en razón de su longitud de onda superior.

Eliminados los restos de pequeñas ondas que pudieran restar por la acción del filtro de parada, la luz emitida llega al ocular (Oc) donde forma la imagen.

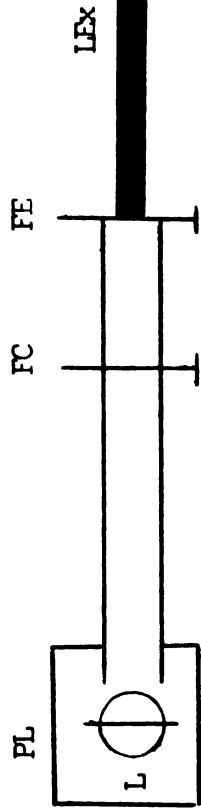
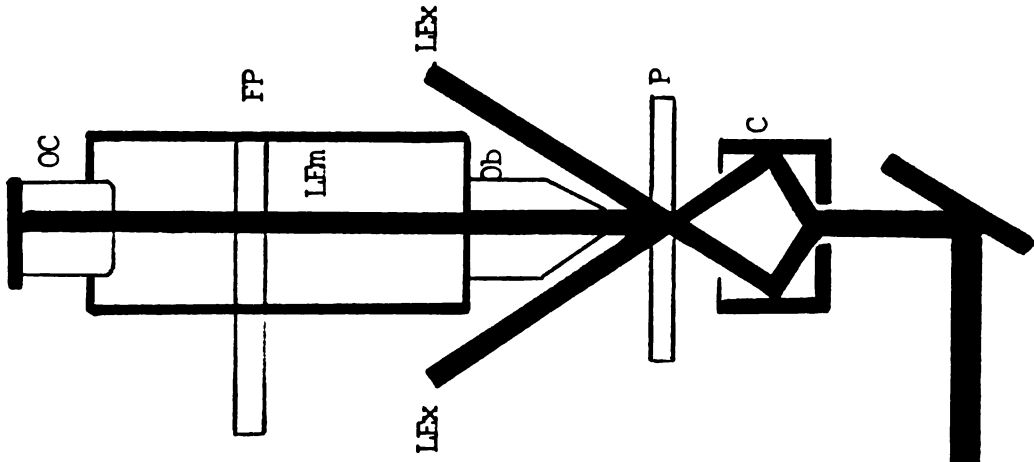
El sistema tiene sobre el precedente la ventaja de poder utilizar objetivos de gran aumento.

Para un diagnóstico de rutina los dos sistemas son adecuados.

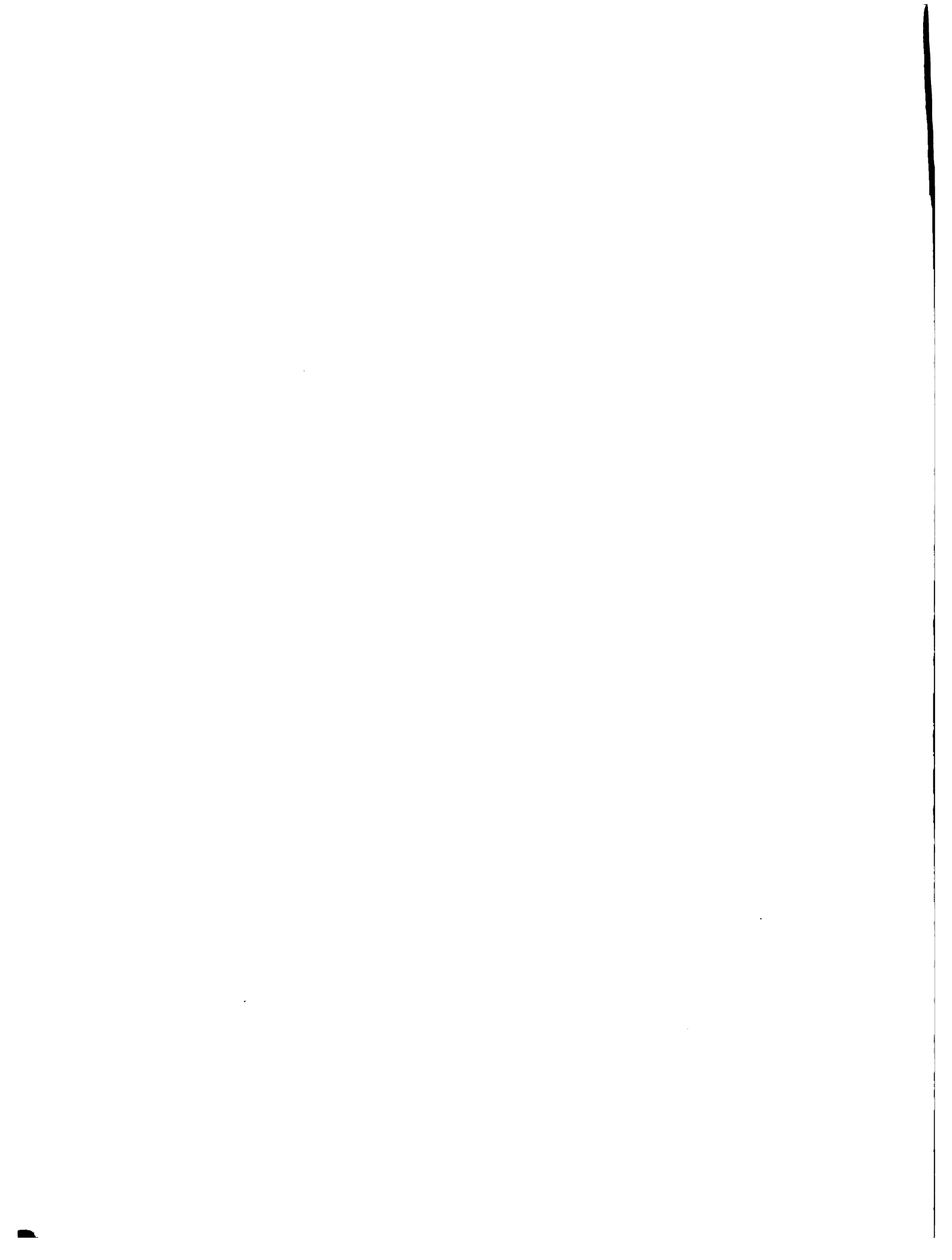
Actualmente ciertos microscopios utilizan como filtro de excitación un filtro llamado interferencial, este filtro refleja las grandes ondas luminosas en vez de absorberlas como hacen los filtros clásicos.

MICROSCOPIO FLUORESCENCIA

Luz Transmitida



- L - Lámpara
- LEx- Luz excitadora
- LEm- Luz Emitida
- PL - Porta-lámpara
- C - Condensador Fondo Oscuro.
- P - Preparación
- FE- Filtro Excitación
- FC - Filtro anticalorífico
- FP - Filtro de Parada
- Ob - Objetivo
- Oc - Ocular



Dr. Veterinario Domicilio
 Propietario Domicilio de la Explotación
 Condiciones Higiénicas Tipo de Alimentación

INFORMACIONES CLINICAS

Origen y descripción de la enfermedad:..... Fecha de aparición del
 1er. enfermo
 1er. muerto
 Evolución media de la enfermedad:...

	Verracos	Cerdas de vientre	Lactantes	< 40 K	> 40 K.
Efectivo					
*Entradas de animales los 60 últimos días					
‡Vacunaciones P.P.C.					
Cantidad de muertos					
Cantidad de enfermos					

<u>SINTOMAS</u>		Temperaturas Constatadas	
Cutáneos	Verracos
Digestivos	Cerdas
Pulmonares	Lactantes
Nerviosos	< 40 K.
Reproducción (abortos)	> 40 K.
Diversos		
		

* Seguida de V, si vacunados P.P.C.

‡ Precisar el tipo de vacuna.

DEMANDA DE ANALISIS

Dr. Veterinario Domicilio
 Propietario Domicilio de la Explotación
 Condiciones Higiénicas Tipo de Alimentación

INFORMACIONES CLINICAS

Origen y descripción de la enfermedad:..... Fecha de aparición del
 1er. enfermo
 1er. muerto
 Evolución media de la enfermedad:..

	Verracos	Cerdas de vientre	Lactantes	< 40 K	> 40 K.
Efectivo					
*Entradas de animales los 60 últimos días					
‡Vacunaciones P.P.C.					
Cantidad de muertos					
Cantidad de enfermos					

SINTOMAS

Cutáneos
 Digestivos
 Pulmonares
 Nerviosos
 Reproducción (abortos)
 Diversos

Temperaturas Constatadas

Verracos.....
 Cerdas
 Lactantes.....
 < 40 K.....
 > 40 K.

* Seguida de V, si vacunados P.P.C.

‡ Precisar el tipo de vacuna.

LESIONES

Cantidad de Autopsias realizadas:

Sobre animales muertos
Sobre animales sacrificados

Localización

Descripción de las lesiones

Frecuencia

- Externas
- Bazo
- Riñón
- Ganglios
- Corazón
- Pulmón
- Estómago
- Intestinos
- Diversa

--	--	--

DIAGNOSTICO CLINICO:

Muestras enviadas al laboratorio:

- Visceras
- Sangre de febriles
- Sangre de convalescientes.....

Fecha y Firma

Fecha de envío:.....
Medio de transporte

PARTE RESERVADA AL LABORATORIO.

Fecha de Llegada:

Estado de conservación:

Fechas de respuestas: Provisional

Definitiva

Nº.....

Diagnóstico Experimental

.....
.....

OBSERVACIONES:

.....

Fecha y Firma:

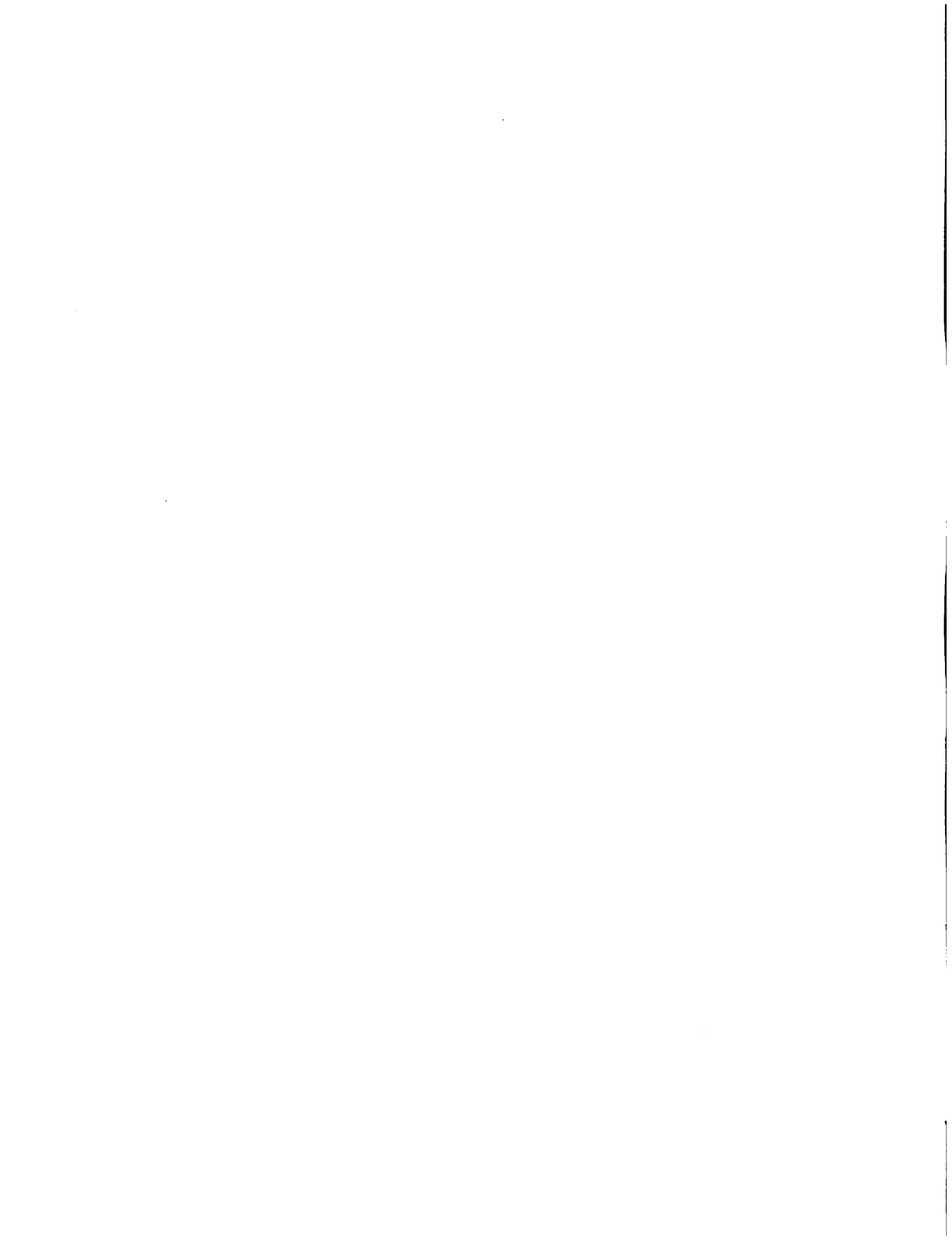
ANEXO IV

Diagnóstico:

- 1- Ficha para la demanda de análisis
- 2- Muestras
- 3- Preparación de Inóculos

Diagnóstico Experimental sobre animales:

- 4- Por inoculación al cerdo
(Diferencial P.P.A / P.P.C.)
- 5- Por inoculación al conejo
(P.P.C.)



VI 2Muestras

Análisis virológicos:

Muestra:

Amígdala, bazo, riñón, ganglios y sangre tomada sobre animales febriles.

Condiciones de la toma:

Asepsia en la autopsia, que se practicará sobre agonizantes sacrificados o muertos en las últimas doce horas. El mínimo de muestras a enviar será el correspondiente a la autopsia de cuatro animales.

Análisis serológicos:

Muestra:

Suero,

Condiciones de la muestra:

Recogido sobre animales convalescientes de la enfermedad. El mínimo de muestras a enviar es de 20, después de aplicar la fórmula $\frac{N-20}{4}$ en caso de control serológico.

Envío al laboratorio:

En todos los casos, el envío se realizará por el camino más rápido, bajo la protección del frío (4°), y en un embalaje herméticamente cerrado. La muestra debe estar acompañada por la ficha de demanda de análisis, debidamente llenada.

IV 3

DIAGNOSTICO DE LA P.P.A.

Preparación de Inóculos:

A partir de sangre heparinada, realizar una dilución a 1/10 en solución Salina Tamponada tipo P.B.S., Hank's o Earle.

A partir de vísceras:

- Aislar de la muestra un trozo de aproximadamente 4 grs. .
- Cortarlo en finos pedazos.
- Mezclarlo con cuatro veces su volúmen con solución P.B.S., Hank's o Earle.
- Triturar el tejido:
 - a la mano : Mortero
Tembroeck
Potter, etc.
 - Triturador
Eléctrico: Thurrax
Turmix, etc.

En caso de emplear un triturador eléctrico, procurar que la cámara de trituración no se caliente en exceso, con la consiguiente pérdida de virus. Para ello conservar las cámaras antes de uso en el congelador a 20°C., y sumergirla en un baño de agua helada durante la trituración.

- Centrifugar el material triturado a 4000 r.p.m. durante 15 minutos.
- Recoger el sobrenadante.
- Añadir una concentración final de antibióticos por cc.
 - Penicilina 3000 U.
 - Estreptomicina.... 3 mg.
- Dejar reposar 2 horas a temperatura de laboratorio, o toda la noche a 4°C.
- Realizar un control bacteriológico por siembra en agar y caldo.

El inóculo así obtenido, representa el macerado a 20% del órgano elegido, y puede dividirse en dos fracciones de aproximadamente 10 cc. cada una. La primera servirá para su uso inmediato, la segunda se conservará a 20°C, para su estudio posterior si se considera necesario.

IV 4

DIAGNOSTICO DIFERENCIAL P.P.A./P.P.C.

Reproducción experimental de la enfermedad

Base científica: La ausencia de inmunidad cruzada entre las dos pestes.

Material:

Cerdo Hiper-immune P.P.C.

Protocolo de inmunización:

J_0 - Vacunación

J_{21} - Recuento de vacunación

J_{45} - Inoculación de prueba con virus patógeno P.P.C. (La cepa de la P.P.C., elegida como virus de prueba debe ser altamente virulenta, y la dosis inoculada, suficiente para producir la muerte del cerdo, como lo demostraran los testigos no vacunados e inoculados al mismo tiempo con la misma dosis).

J_x - Repetir la inoculación de prueba cada 2-3 meses.

Cerdo receptible P.P.C.

Cerdo no vacunado.

Este criterio no es por si solo suficiente para declarar un cerdo receptible a la P.P.C., la mejor técnica actual para conocer su receptibilidad es un exámen de anticuerpos, con resultado negativo. En ausencia de este exámen emplearemos cerdos no vacunados, nacidos de madre no vacunada, y con hermanos habiendo servido y sucumbido, como testigos de las inoculaciones de prueba durante la hiper-immunización.

Inóculo:

Preparado como descrito en el anexo.

Método:

Los cerdos destinados a la hiper-immunización estarán alojados separadamente de los cerdos receptibles, hasta el momento de efectuar la inoculación diagnóstica.

Una vez preparado el inóculo, meter en una caja con garantía de aislamiento, un cerdo receptible y un cerdo hiper-immune.

Inocular a cada animal 1-2 cc. de inóculo en los músculos del cuello, detrás de la oreja.

Tomar diariamente la temperatura por la mañana y por la tarde.

Observar clínicamente los animales todos los días, durante 3-4 semanas, anotando las alteraciones que presenten.

A la autopsia, por muerte o sacrificio, anotar las lesiones y guardar muestras.

Lectura e interpretación

Cerdo Sensible	Cerdo Hiper-Immune	Agente Causal
+	0	P.P.C.
+	+	P.P.A.
0	0	Tomar muestras para otros análisis si necesarios.

+ - Reproducción de la enfermedad.

0 - No reproducción de la enfermedad.

IV 5

DIAGNOSTICO PESTE PORCINA CLASICA P.P.C.

Técnica de Inoculación al Conejo (Bélgica)

Base científica:

El conejo inoculado con el virus de la peste porcina clásica, adquiere un estado de protección- que se manifiesta por la inhibición de la fiebre, consecutiva a la inoculación 7 días después, de una cepa lapinizada hipertermizante, del mismo virus P.P.C.

Material:

Conejos raza común (de preferencia el blanco ordinario), sexo indiferente peso de 2 a 3 kilos, y de menos de un año.

Virus hipertermizante.

Suspensión a 10 por ciento de bazo y sangre, de conejos sacrificados en el acmé térmico producido por la inoculación intravenosa de una cepa hipertermizante (tipo "china").

En estas condiciones, la suspensión viral posee 10^5 dosis hipertermizantes conejo 50 por ciento por cc. y se conserva sin pérdida de título a 70°C.

Virus a diagnosticar.

Inóculo preparado como se indica en el anexo, centrifugado a 20.000 r. p. m. durante 30 minutos (1).

Método:

- . Día 0 - Inocular en la vena marginal de la oreja 1 cc. del inóculo a diagnosticar.

1- El inóculo centrifugado a 4000 r.p.m. puede inocularse por la vía intraperitoneal, a 4 - 5 cc. de suspensión.

- . Días 1 a 7 - Tomar la temperatura rectal, tres veces por día (8, 12 y 16 horas).
- . Día 7 - Inocular por vía intravenosa 1 cc. de virus hipertermizante conteniendo aproximadamente 199 dosis hipertermizante conejo 50%.
- . Días 8 a 11 - Tomar la temperatura tres veces por día como se indica.

Lectura de interpretación.

La lectura se realiza por el estudio de los gráficos de temperatura. La hipertermia es la elevación de la temperatura de al menos un grado. La temperatura normal media de un conejo es aproximadamente de 39°C, por lo que consideramos como hipertermia las temperaturas iguales o superiores a 40°C. La presencia de la hipertermia es generalmente breve (un día), y suele estar precedida por una temperatura ligeramente elevada entre 39 y 40°5.

El cuadro siguiente, resume la interpretación:

Primera inoculación Virus a diagnosticar	7 días	Segunda inoculación Virus hipertermizante	Interpretación
Ausencia de Hipertermia		Ausencia de Hipertermia	Presencia del virus P.P.C. en primer inóculo
		Presencia de Hipertermia	Ausencia de virus P.P.C. en primer inóculo
Presencia de Hipertermia		Ausencia de Hipertermia	Presencia de virus P.P.C. (hipertermizante) en primer inóculo
		Presencia de Hipertermia	Ausencia de virus P.P.C. en primer inóculo

ANEXO V

Diagnóstico Experimental sobre Cultivo de Tejidos

Identificación Viral:

- 1- If. sobre los órganos
- 2- Hemoadsorción
- 3- If. sobre el cultivo de
Leucocitos.
- 4- Gel-Precipitación

V I

DIAGNOSTICO POR IDENTIFICACION VIRAL

Inmunofluorescencia aplicada sobre los órganos recibidos

Material:

Criostato

Conjugado fluorescente monoespecífico P.P.A. Ver anexo.

Acetona refrigerada a 20°C.

P.B.S. a PH=7'2. Ver anexo

Glicerina Tamponada- Ver anexo.

Microscopio de fluorescencia. Ver anexo.

Método:

Realizar a partir de los órganos recibidos, y de preferencia de las amígdalas, cortes al criostato. Si no se dispone de este aparato, se puede ensayar pero con rendimiento inferior, la realización de calcos o impresiones directamente sobre el portaobjetos.

Secar.

Fijar a la acetona refrigerada durante 10 minutos.

Aplicar unas gotas de conjugado fluorescente de manera a cubrir la preparación.

Dejar actuar a 37°C., en cámara húmeda, durante 30 minutos.

Lavar con P.B.S. al menos tres veces, diez minutos cada vez.

Montar el cubreobjetos con glicerina tamponada.

Lectura o interpretación.

La lectura se realiza al microscopio de luz fluorescente.

La positividad se manifiesta por : presencia de fluorescencia sobre la inclusión del citoplasma, en ausencia de fluorescencia sobre el núcleo.

V 2

DIAGNOSTICO DE LA P.P.A. POR IDENTIFICACION VIRAL.

Test de Malmquist y Hay - Hemoadsorción HAD

Base científica:

La multiplicación del virus de la P.P.A. sobre el cultivo de leucocitos se manifiesta, cuando las células se examinan en "fresco", por la aparición de la hemoadsorción (HAD), seguida 48 - 72 horas después de una lisis celular (ECl)

Reactivos:

Tubos de virología de 16/160 con cultivo de leucocitos de 2 - 5 días.
Inoculums. macerado de órganos al 20% en P.B.S. (sin Ca ni Mg)

Técnica:

Inocular tres tubos por muestra, a razón de 0'2 cc. por tubo.

Observar diariamente los tubos al microscopio ordinario.

Para realizar una lectura correcta es necesario: Al coger el tubo, hacerlo girar varias veces sobre su eje longitudinal, para separar sin brusquedad, los hematies sedimentados de los leucocitos adheridos a la pared del tubo. Colocar el tubo en el microscopio de manera que el cultivo se encuentre a la mínima distancia de la lente frontal del objetivo.

Resultado:

La presencia del virus se traduce por la aparición de una o varias coronas de hematies que se adhieren a la periferia de un cierto número de leucocitos.

La HAD, se presenta en función de la concentración viral en el inóculo entre 8 horas y 8 días. La cantidad de HAD aumenta con el tiempo hasta que el ECl pone un término al cultivo.

La ausencia de HAD y ECl denuncia la ausencia de virus en el material

inoculado.

La presencia del ECl en ausencia de HAD, motiva:

- a- La aplicación de la Inmunofluorescencia sobre el sedimento celular-
- b- El paso del sobrenadante a otros cultivos, sobre los que se realizará la lectura en la forma descrita y con los mismos criterios de interpretación.

V 3

DIAGNOSTICO POR IDENTIFICACION VIRAL

Imunofluorescencia Aplicada sobre el Cultivo de Leucocitos

Material:

Leucocitos cultivados sobre cubreobjetos al interior de tubos tipo "Leighton", inoculados y no inoculados, que servirán de testigos.

Acetona refrigerada a -20°C .

Conjugado fluorescente monoespecífico P.P.A.

P.B.S. a $\text{pH} = 7.2$

Glicerina tamponada.

Microscopio de fluorescencia.

Método:

- . Es necesario proveer, en caso de diagnóstico de ausencia de virus al menos ocho tubos testigos no inoculados.
- . Veinticuatro horas después de la inoculación y cada veinticuatro horas siguientes, se tomará un cubreobjetos con cultivo inoculado y un cubreobjetos con cultivo no inoculado- que se secarán al aire templado y se fijarán a la acetona refrigerada a -20°C .
- . El resto de operaciones, lectura e interpretación son los mismos que los indicados en el anexo.

VARIANTE PROPUESTA POR EL LABORATORIO DE REFERENCIA

DE MADRID ESPAÑA.

Esta variante tiene la ventaja de poder realizar a partir de un mismo tubo de cultivo, las observaciones necesarias para el diagnóstico por HAD y por IF. y se ha revelado de una gran utilidad para el diagnóstico de cepas que dan una

HAD débil o de aquellas que no la dan.

A partir de los tubos preparados para la observación de la HAD. (tres tubos de virulología por muestra) y durante su observación cotidiana se puede presentar el caso en que aparezca un efecto citopático en ausencia de imágenes de HAD. En este caso entra en aplicación la variante propuesta de la manera siguiente:

Agitar moderadamente el tubo, al objeto de desprender el máximo de células.

Recoger el sobrenadante y mezclarle a cuatro veces su volumen de P.B.S. o de Sol. Hank's.

Centrifugar a 1000 r.p.m. durante 15 minutos.

Tirar el sobrenadante, realizar un frotis con las células del concentrado de sedimentación.

Secar.

Fijar a la acetona refrigerada, durante diez minutos.

Secar.

El resto de la técnica, lectura o interpretación, son los expuestos en el anexo.

Precipitación en Agar (Ouchterlony)

Aplicación a la identificación viral.

Material:

- Solución Tampon Fosfato 0'01 M. pH=7'2
 a- ClNa 87.675 grs.
 Agua desmineralizada 1000 cc.

b- PO_4HNa_2 (1 H_2O) 54'59 grs.
 $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$ (anhidrido) 15'94 "
 Agua desmineralizada 1000 cc.

Mezclar 800 cc. de a con 160 cc de b.

Completar con 8 litros de aguas desmineralizada

- Agar Noble Difco

Placas de Reacción:

Preparar una solución de Agar a 1'5 % en tampon fosfato.

Depositar 12 cc. en una placa de petri de 10 cm. de diámetro

Las placas así preparadas pueden conservarse a 4°, durante una semana.

Para su uso:

Preparar cuatro rosetas de siete alveolos cada una. Un alveolo central rodeado de seis equidistantes. Cada alveolo mide 7 milímetros de diámetro y está separado del central de 4 mm..

Antígeno:

Fragmento de órganos a examinar, finamente triturados.

Suero:

Control positivo y negativo, inactivados a 56° durante 30 minutos.

Técnica:

- Colocar en el pocillo central un antígeno control positivo.
- Colocar los antígenos a examinar en los alveolos 1, 3 y 5
- Dejar difundir una hora.
- Colocar el suero control positivo en los alveolos 2 y 4.
- Colocar el suero control negativo en el alveolo 6.
- Dejar a temperatura ambiente en cámara húmeda.
- Leer a : 16, 24, 36, 48 y 72 horas.

ANEXO VI

Diagnóstico Experimental

Detección de Anticuerpos:

- 1- Inmuno-Fluorescencia-Indirecta (IFI)
- 2- Preparación del Antígeno Soluble
- 3- Inmuno-Electro-Osmo-Foresis (IEOF)
- 4- Enzema-Linked-InmunoSorben-Assay
(ELISA)
- 5- Inhibición de la Hemoadsorción (IHAD)
- 6- Inmuno-Difusión-Radial (IDR)
- 7- Fijación de Complemento (FdC)

VI 1

DIAGNOSTICO DE LA P.P.A. DETECCION DE ANTICUERPOS

Inmunofluorescencia Indirecta IFI

Reactivos:

Antígeno. Cubre-objetos sobre los que se cultiva las células de la línea MS., son inoculados con el virus de la P.P.A., adaptado a este sistema celular.

Fijar estas preparaciones cuando los cultivos de control indiquen la aparición del efecto citolítico, lo que suele ocurrir entre 2 y 3 días de post-inoculación. La fijación se realiza por acción de la acetona pura a -20°C , durante diez minutos. El antígeno así fijado puede emplearse inmediatamente o conservarse a -20°C .

Técnica de Reacción.

Lavar el cubre=objeto antígeno varias veces en PBS. y secar al aire templado.

Depositar unas gotas de la dilución a 1/10 del suero problema, de manera que todo el cultivo quede cubierto.

Dejar reposar 30 minutos a 37°C . en ambiente húmedo.

Lavar tres veces, durante 10 minutos cada una, en PBS.

Recubrir la preparación con unas gotas de globulina antiglobulina de cerdo, marcada con isotiocianato de fluoresceína.

Dejar en reposo 30 mins. a 37°C en ambiente húmedo.

Lavar tres veces con PBS. durante 10 minutos cada vez.

Montar con glicerina tamponada.

Observar al microscopio fluorescente.

Resultado:

La presencia de fluorescencia, sobre la inclusión citoplasmática, indica la presencia de anticuerpos específicos de la P.P.A. en el suero analizado.

Recordaremos que la IFI es el test de referencia en serología de la P.P.A. y que es posible utilizarla a gran escala según la técnica miniaturizada y automatizada puesta a punto por el Laboratoire Central de Recherches Veterinaires d'Alfort.

VI 2

Antígeno Soluble

Es el antígeno que se emplea tanto para IFOF como para ELISA.

Preparación:

Cultivo de células Vero monoestratificado.

Inocular el virus adaptado en la proporción de 2/1

Dejar dos horas en contacto a 37°

Añadir el medio de cultivo, adicionado de dos por ciento de suero de ternera.

Incubar a 37°

Cuando el efecto citopático se generaliza, recoger todas las células del cultivo, si es necesario por tripsinación.

Centrifugar a 100 g. durante 20 minutos.

Resuspender el sedimento en dos veces su volumen de PBS.

Sonicar tres veces durante un minuto a 50 W.

Centrifugar a 45000 g., durante 45 minutos.

El sobrenadante así obtenido es el antígeno soluble; que filtrado o no por milipore será sometido a una titulación frente a la técnica a emplear, para determinar la dosis de trabajo.

VI 3Inmuno-Electro-Osmo-Foresis IFOF

Base científica:

La formación de líneas de precipitación, por la unión antígeno-anticuerpo, se ve acelerada por el paso de la corriente eléctrica.

Material y reactivos:

Equipo de electroforesis, capaz de producir una corriente eléctrica de por lo menos 400 voltios.

Antígeno P.P.A.

Tampón Veronal-Acetato a pH=8'6

Barbital sódico 9 grs.

Acetato sódico 6 "

Agua-1000 cc.

Ajustar a PH=8'6 por adición controlada de unas gotas de ClH normal

Agar a 0'6 %

Agar 6 grs.

Tampón veronal-acetato330 cc.

Agua660 cc.

Pasar la mezcla por baño María hasta que el agar se presente como un líquido uniformemente transparente.

Repartirlo en fracciones adecuadas a los soportes de electroforesis.

Conservación a 4°C.

Técnica.

Fundir el agar en el baño María

Cubrir el soporte de electroforesis, de una capa de agar de 1 - 3 mm. de espesor, la capa debe ser uniforme y no contener burbujas de aire.

Estabilizar el agar por un reposo de no menos dos horas, en atmósfera húmeda.

Practicar los pocillos de la reacción, con la ayuda de un sacabocados de 0'3 cms.

Cada reacción antígeno-anticuerpo precisa de dos pocillos, que deben estar separados de 1 cm. en el mismo sentido que el paso de la corriente eléctrica.

Depositar una gota de antígeno en el pocillo más próximo al electrodo positivo.

Depositar una gota de suero en el pocillo más próximo al electrodo negativo.

Llevar el soporte a la cuba de electroforesis, y según las características de cada aparato, manipular para hacer pasar una corriente de 400 W durante 30 minutos.

La lectura se realiza a los 30 minutos. Los casos dudosos serán releídos después de una estancia de 4 y 24 horas, en solución de cloruro de sodio a 2%.

Resultado:

La positividad está representada por la presencia de una línea de precipitación entre el pocillo antígeno y el pocillo anticuerpo.

VI 4Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay ELISA

Soluciones a preparar:

- Solución Carbonato-Bicarbonato para la dilución del antígeno.

CO_3Na_2	1'59	Grs.
CO_3HNa	2'93	"
N_3Na	0'20	"
Agua desmineralizada		1000	cc.

- Solución para lavar

Tween 20	0'5	cc.
Solución Salina Fisiológica a 0'85%..		1000	cc.
Conservar a 4°			

- Solución para diluir sueros y conjugados

ClNa	8'00	Gr.
ClK	0'30	"
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$	0'20	"
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$ (12 H_2O)	2'90	"
N_3Na	0'20	"
Tween 20	0'50	cc.
Agua demineralizada	1000	cc.
pH= 7'4. Conservar a 4°			

- Solución para diluir el revelador o substrato

Diluir 2'14 gramos de ácido cítrico en 100 cc. de agua.

Diluir 3'54 gramos de fosfato disódico ($2 \text{H}_2\text{O}$) en 100 cc. de agua, mezclar ambos y completar a 400 cc. con agua desmineralizada.

- Solución reveladora o substrato

A preparar en el momento del empleo.

O.P.D. (O. Fenileno diamina) 20 miligramos

Solución para diluir el revelador 50 cc.

Agua oxigenada a 30% 20 microlitros.

- Solución de Ácido Sulfúrico 3N para finalizar la reacción.

Elementos de la Reacción:

- Antígeno, antígeno soluble
- Suero, sueros a analizar y control positivo y negativo.
- Conjugado; globulinas IgG anti Globulinas de cerdo conjugadas a la peroxidasa.
- Revelador o substrato, O. Fenilenodiamina

Material:

- Placas en poliestireno, de 96 alveolos Tipo M-129 B Dynatech.
- El material para cargar las placas, realizar las diluciones, etc., puede ser a uso único o automático.
- La lectura, que puede realizarse directamente por diferencia de intensidad de color, gana en seguridad con el empleo de un espectro-fotómetro especialmente creado para la lectura de estas placas. (Multieskan Titertek)

Sensibilización de las placas:

- Diluir el antígeno soluble a la dilución de trabajo en la solución carbonato-bicarbonato.
- Depositar 100 microlitros por alveolo.
- Dejar bien horizontalmente durante una noche a 4°
- Evitar las evaporaciones.
- Lavar cuatro veces con la solución de lavado a 4°
- Secar.
- Las placas así preparadas y bien cerradas se pueden conservar unos tres meses en el frigorífico.

Protocolo de la Reacción:

Los sueros a analizar se diluyen a 1/20 en la solución Tween pH=7'4
Introducir 100 microlitros de estas diluciones en cada alveolo. El número de alveolos por suero depende de las disponibilidades en antígeno.

Dejar una hora a 37°; evitar la evaporación.

Lavar cuatro veces con la solución de lavado.

Introducir 100 microlitros de Conjugado a la dilución de trabajo empleando como diluidor la solución adecuada.

Dejar una hora a temperatura de laboratorio

Lavar cuatro veces.

Introducir 100 microlitros de sustrato en cada alveolo y dejar 10 minutos a temperatura de laboratorio.

Frenar la reacción añadiendo 100 microlitros de Acido Sulfúrico 3 N en cada alveolo.

Dejar 5 minutos a la temperatura de laboratorio.

Interpretación:

La presencia de anticuerpos en los sueros analizados se detecta por una coloración marrón-rojiza en los alveolos positivos, los alveolos negativos presentando un color más amarillento.

Si la lectura se realiza a través de un espectro fotómetro, es conveniente utilizar un filtro de 492 nanómetros.

Nota:

Una monografía elaborada por el grupo de trabajo creado para este efecto, por el Mercado Común Europeo, será publicada próximamente.

La monografía describe las técnicas empleadas así como los estudios con ellas realizados por los Laboratorios Nacionales de: Madrid; España, Lisboa; Portugal, Pirbright; Inglaterra y Alfort; Francia.

La monografía fue realizada bajo la dirección del Dr. J.M. Sánchez Vizcaíno, inmunólogo del Laboratorio de Referencia de Madrid, y junto a los Laboratorios citados fueron asociados en diferentes momentos los trabajos de los laboratorios de Hanover; R. F. A. y Perugia; Italia.-

VI 5Tipificación del antígeno o de los anticuerpos P.P.A.

Inhibición de la Hemoadsorción I.HAD

Base científica:

La eliminación de los hematies de la Had. producida por la multiplicación del virus de la P.P.A., no impide la reproducción del fenómeno en presencia de nuevos hematies.

En la técnica descrita los hematies se destruyen por intermedio de un choque osmótico.

Reactivos:

Cultivo de leucocitos de 3-5 días

Virus de una cepa controlada.

Solución salina al 4 por mil.

Suspensión al 1% de hematies del animal al origen del cultivo (cerdo donador).

Medio de cultivo conteniendo suero de cerdo donador.

Técnica:

Inocular una serie de tubos de cultivo.

Observar los tubos hasta que aproximadamente, el 60% de las células presenten Had.

Tirar el medio de cultivo.

Lisar los hematies por adición de 2'00 cc. de la solución salina al 4 p. mil que se dejarán en contacto 1 - 2 minutos.

Añadir 2 cc de medio de cultivo, al que se añaden 0'2 cc. de suero problema.

Dejar en contacto 1 hora a 37°C.

Añadir 1 - 2 gotas de la suspensión de hematies.

Dejar sedimentar los hematies durante 1 hora a 37°C.

Lectura.

Resultado:

La presencia de anticuerpos inhibidores de la Had., se manifiesta por la ausencia de esta Had. con relación a los tubos testigos tratados de la misma manera, con suero negativo.

Observación:

La técnica se aplica de la misma manera para tipificar un virus, si la reamizamos en presencia de un suero control de origen desconocido.

VI 6Inmuno-Difusión Radial

Búsqueda de anticuerpos.

Material:

Placas de Petri 6 Cms.

Agarosa al 8% en tampón Veronal de fuerza iónica 0'033

Antígeno, el mismo empleado para la IFOF.

Tampón Veronal:

Barbital sódico 13'38 Grs.

Acetato sódico 3 H₂O 8'83 "

Agua desmineralizada 1500.00 cc.

Para su empleo mezclar una parte de este tampón (0'1 de fuerza iónica) con dos partes de agua desmineralizada.

Técnica:

Mezclar 3 cc. de agarosa con un cc. de antígeno, agitar bien.

Cubrir la placa de Petri, con los cuatro cc. de la mezcla.

Una vez solidificada la agarosa, abrir tantas cúpulas como se necesiten, con diámetro de 3 mm.

Llenar las cúpulas con los sueros problemas.

Dejar reposar en atmósfera húmeda a temperatura de laboratorio.

Lectura:

Con luz indirecta a 4, 18, 24, 48, 72 y 96 horas.

Interpretación:

La formación de un anillo de precipitación alrededor de la cúpula, señala la presencia de anticuerpos en el suero.

VI 7

FIJACION DE COMPLEMENTO

Búsqueda de anticuerpos.

Elementos de la reacción:

1- Antígeno,

Extracto de bazo al eter-acetona: Se recoge el bazo de un cerdo muerto de la infección experimental de P.P.A., evolución aguda.

Triturar 10 grs. de bazo en 20 cc. de eter- acetona aa.

Agitar a 4°C, durante toda una noche.

Centrifugar a 2000 r.p.m. durante 15 minutos

Tirar el sobrenadante.

Extender el sedimento en una placa de petri, y dejar evaporar el eter-acetona.

Suspender el polvo así obtenido, en 20 cc. de solución salina (9 p mil).

Agitar a 4°C durante una noche

Centrifugar a 1000 r.p.m. durante 15 minutos

Tirar el sobrenadante.

Extender la sedimentación en una placa de petri, y dejar evaporar el éter-acetona.

Suspender el polvo así obtenido, en 20 cc. de solución salina (9 p mil)

Agitar a 4°C., durante una noche.

Centrifugar a 1000 r.p.m. durante 15 minutos.

El sobrenadante es el antígeno.

Titulación del Antígeno:

Esta mezcla contiene:	Dilución del Suero control formolado	0'4 cc
	Dilución del antígeno	0'2 "
	Suero normal de ternera 1/160	0'2 "
	Complemento 2 U. 100%	0'2 "

Preveer testigos del suero y de la mezcla antígeno-suero ternera.

Dejar toda la noche a 4°C.

Dejar 15 minutos a 37°C.

Añadir 0'2 cc de hematies sensibilizados

Dejar una hora a 37 °C'

Dejar sedimentar a 4°C.

Lectura:

Se suele utilizar el antígeno diluido a 1/4, 8, 16, 32- 64 y 128

El suero control a 1/10, 20, 40, etc.

La dilución más elevada de antígeno que fija el complemento con la dilución más alta de suero es el título, o unidad del antígeno. En la reacción se suelen emplear dos dosis de antígeno.

Se conserva a 60°

2-Suero Problema.

Inactivar a 56°C., durante 30 minutos.

Añadir 0'2 cc. de formol (a 1/72) por cada cc. de suero, a fin de eliminar su poder procomplementario.

Incubar a 37°C, durante 45 minutos.

Preparar diluciones de razón 2 en tampón veronal Ca. y Mg.

Para su uso se emplearán las tres diluciones siguientes, 1/10, 20 y 40.

3- Suero Ternera.

Se seleccionan sueros de ternera de débil actividad anticomplementaria.

Mezclar 15 cc. de suero fresco de ternera, con 1 cc. de glóbulos rojos de carnero lavado.

Dejar reposar a 4°C., durante 45 minutos.

Centrifugar a 1000 r.p.m. durante 15 minutos.

Recoger el suero.

Conservar a 60°C.

Estas operaciones tienen por objeto eliminar un posible poder hemolítico del suero de ternera.

Para la reacción se suele emplear 0'2 cc. de la dilución 1/160 en Tampón Veronal.

4- Complemento.

Se utilizan 2 U. hemolíticas 100 % , en un volumen de 0'2 cc. de tampón Veronal.

5- Sistema hemolítico.

Suspensión de hematies de carnero, lavados y recogidos a 2%.

Mezclar con igual volumen de hemolisina diluida.

En la reacción se emplean 0'2 cc. conteniendo 4 unidades hemolíticas.

Técnica

Mezclar los elementos de la reacción en las siguientes proporciones:

Dilución del Suero Problema, 1/10, 20, y 40.....	0'4 cc.
Dilución del Antígeno	0'2 "
Suero Normal de Ternera diluido a 1/160	0'2 "
Complemento (2 U H 100%)	0'2 "
Sistema Hemolítico	0'2 "

Protocolo.

Dejar los cuatro primeros reactivos toda la noche a 4°C.

Dejar 15 minutos a 37 °C

Añadir el último reactivo (sistema hemolítico)

Dejar 1 hora a 37°C.

Dejar a 4°C, hasta sedimentación completa de hematies

Lectura.

ANEXO VII

Cálculos.

- 1- Título de una suspensión viral.
- 2- Método de Reed & Muench.
- 3- Método de Spearman & Karber
- 4- Ajustamiento de Dosis por unidad de
Volúmen.
- 5- Cálculo de Diluciones.

VII 1Título de una suspensión Viral

Los análisis cuantitativos virales tienen por objeto valorar la cantidad de material virulento que tiene una suspensión, en función de un carácter viral.

Según el efecto valorado el título puede ser diferente, por lo que es necesario indicar el parámetro que ha de servir a la valoración. Así la dosis infectante sobre el animal puede ser infectante a la dosis infectante sobre cultivo de tejidos, y sobre la dosis calculada por efecto citolítico, puede ser diferente a la observada por inmunofluorescencia.

Es igualmente necesario expresar la unidad en la que se realiza la valoración la dosis 100 p. cien es diferente de la dosis 50 p. cien. Es necesario indicar el volumen de suspensión al que hace referencia la respuesta.

Es necesario recordar que la concentración se expresa con un exponente logarítmico positivo, y la dilución con un negativo. Si en un cc. hemos detectado 10000 dosis su expresión es $10^{4'0}$, o hay una dosis en la dilución $10^{-4'0}$.

La unidad más empleada en virología es la D 50 por cien, es decir la dosis o dilución que aplicada sobre un conjunto de animales o tubos responde con 50 por cien de positivos y 50 por cien de negativos.

Supongamos que hemos inoculado diez tubos para cada una de las diluciones 10^{-2} (1/100), 10^{-3} (1/1000) y 10^{-4} (1/10000) y que hemos observado los resultados siguientes: 10^{-2} , 10 tubos positivos, 10^{-3} , 5 tubos positivos, y 10^{-4} , 0 positivos, la dosis 50 por cien corresponde a la dilución 10^{-3} .

Pero si la observación de la dilución 10^{-3} , hubiera presentado tres positivos y siete negativos, la dosis 50 por cien estaría situada entre 10^{-2} (respues

ta 100 por cien positiva) y 10^{-3} (respuesta 30 por cien positiva).

El cálculo exacto de la dilución que presenta una dosis 50 por cien precisa un cálculo estadístico que generalmente se realiza por uno de los dos métodos siguientes: "Reed & Muench" y "Spearman & Karber", que se describen en los anexos 2 y 3.

VII 2

METODO DE REED & MUENCH

Determinación del título de una suspensión viral.

Ejemplo:

A partir de una suspensión viral, hemos realizado una serie de diluciones de razón 10, que se extienden de 10^{-1} a 10^{-6} (1/10 a 1/1000 000).

Con cada dilución se han inoculado 10 tubos de cultivo celular, a razón de 0'2 cc. por tubo. Al cabo del período normal de lectura, los resultados obtenidos se resumen en el cuadro siguiente, según la expresión habitual: Cantidad de tubos positivos por dilución / cantidad de tubos inoculados por dilución.

Diluciones	-1	-2	-3	-4	-5	-6
Resultados	10/10	10/10	8/10	6/10	4/10	0/10
Tubos positivos	10	10	8	6	4	0
Tubos negativos	0	0	2	4	6	10

A la vista de estos resultados procedemos a calcular los "totales acumulados" de la siguiente forma: Los positivos se acumulan sobre las diluciones más bajas (adición de derecha a izquierda). Los negativos se acumulan sobre las diluciones más elevadas (adición de izquierda a derecha).

	-1	-2	-3	-4	-5	-6
Totales positivos	38	28	18	10	4	0
Totales negativos	0	0	2	6	12	22

A partir de estas acumulaciones establecemos una nueva relación positivo/total, a partir de la cual calcularemos el tanto por ciento de positividad para cada dilución;

	-1	-2	-3	-4	-5	-6
Positivo / Total	38/38	28/28	18/20	10/16	4/16	0/22
% Positividad	100	100	90	62'5	25	0

La dilución donde se encuentra el punto 50% de positividad se encuentra entre -4 (62'5) y -5 (25%).

Para calcular exactamente el intervalo entre estas dos diluciones, aplicamos la fórmula:

$$\frac{50 - \% \text{ inmediatamente inferior a } 50\%}{\% \text{ inmediatamente superior a } 50\% - \% \text{ inmediatamente inferior a } 50\%} \times \text{Log. de la razón de la dilución.}$$

$$\frac{50 - 25}{62'5 - 25} \times 1 = 0'666$$

La cifra así obtenida se resta de la dilución en la que la mortalidad es inmediatamente inferior a 50%

$$5 - 0'666 = 4'333$$

Es decir el punto 50% de la dilución se encuentra en la dilución $10^{-4'333}$ o lo que es igual que el título del virus es de $10^{4'333}$ Dosis 50% por 0'2 cc.

Lo expuesto se puede resumir en un solo cuadro de la siguiente forma:

Diluciones	-1	-2	-3	-4	-5	-6
Resultados	10/10	10/10	8/10	6/10	4/10	0/10
Positivos	10	10	8	6	4	0
Negativos	0	0	2	4	6	10
<u>Totales acumulados</u>						
Positivos	38	28	18	10	4	0
Negativos	0	0	2	6	12	22
Positivo/Total	38/38	28/28	18/20	10/16	4/16	0/22
Porcentaje (%)	100	100	90	62'5	25	0

$$\begin{array}{r}
 50 \quad - \quad 25 \\
 \hline
 62'5 \quad - \quad 25
 \end{array}
 \times 1 = 0'666
 \quad
 \begin{array}{r}
 5'000 - 0'666 = 4'333 \\
 10^{-4'333}
 \end{array}$$

Para poder aplicar el método, son necesarias al menos las siguientes condiciones siguientes:

- Que la cantidad de tubos inoculados por dilución sea la misma.
- Que los resultados se distribuyan de una forma normal.
- Que la respuesta 0 y 100 por ciento estén presentes.

VII 3

METODO DE SPEARMAN & KARBBER.

Presenta un cierto número de ventajas sobre el método de cálculo de Reed y Muench, y entre otras la facilidad de cálculo del ecart tipo, lo que permite valorar las fluctuaciones del título, con error admitido del 5%.

Ejemplo:

Tomaremos el mismo ejemplo que nos sirvió para explicar el método Reed y Muench, a partir del cual estableceremos el siguiente cuadro:

Diluciones	-1	-2	-3	-4	-5	-6
Resultados	10/10	10/10	8/10	6/10	4/10	0/10
Tubos positivos	10	10	8	6	4	0
Tubos negativos	0	0	2	4	6	10
% Positividad	100	100	80	60	40	0
% Negatividad	0	0	20	40	60	100

A partir de este cuadro calculamos en primer lugar el Título del virus, aplicando la fórmula siguiente:

$$\text{Log. de la dilución } 50\% = (D_{100} - \frac{r}{2} + (r (\sum \frac{TP}{T}))) \times -1$$

En esta fórmula:

$$D_{100} = \text{La última dilución que presenta } 100\% \text{ de positividad (2)}$$

r = Logaritmo del factor de dilución (Log. de 10 = 1)

\sum = Suma de términos

TP = Total de tubos positivos en cada dilución comprendida entre 100 y 0 % de positividad.

T = Total de tubos inoculados en cada dilución.

Así tenemos que:

$$\begin{aligned} \text{Dilución 50\%} &= \left(2 - \frac{1}{2} + \left(1 \left(\frac{10}{10} + \frac{8}{10} + \frac{6}{10} + \frac{4}{10} + \frac{0}{10} \right) \right) \right) \times -1 \\ &= (1'5 + 2'8) \times -1 \\ &= -4'3 \qquad 10^{-4'3} \end{aligned}$$

Y sobre el mismo cuadro podemos calcular la fluctuación de este título, si aplicamos la fórmula siguiente:

$$\text{Fluctuación} = \sqrt{\frac{r^2}{T-1} \quad \%P \times \%Q \times 2}$$

En la que %P y %Q son los tantos por cientos de positividad y negatividad respectivamente.

$$\text{Así: } \frac{1^2}{10-1} \times (0'8 \times 0'2) + (0'6 \times 0'4) + (0'4 \times 0'6) =$$

$$0'111 \times 0'64 = 0'071; \quad 0'071 = 0'26$$

Por lo que la fluctuación del título del virus sería:

$$4'3 + 2 \times 0'26 \text{ entre } -3'78 \text{ y } 4'82.$$

VII 4Ajustamiento de una cantidad de dosis por unidad de volúmen

Es frecuente que en una reacción serológica, o en la inoculación del animal, nos veamos en la necesidad de ajustar un cierto número de dosis, en un cierto volúmen.

Para lograrlo aplicaremos la fórmula siguiente:

El logaritmo del título de la suspensión viral menos el logaritmo de la dosis deseada, es igual al logaritmo de la dilución a realizar.

Ejemplo:

Tenemos una suspensión viral con un título de $10^{-3'635}$, y queremos preparar una suspensión con 200 dosis infectantes por cc.

$$\text{Log. de } 200 = 2'3$$

$$3'635 - 2'3 = 1'335; \text{ cuyo antilogaritmo es } 21'62$$

Es decir, la dilución 1/21'62 contiene 200 dosis infectantes por cc.

En la práctica, podremos realizar la dilución directamente

1 cc. de la suspensión de origen + 20'62 de diluyente.

o bien partiremos de la dilución 1/10 (10^{-1}), sobre la que realizaremos la dilución 1/2'162.-

VII 5Cálculo de una Dilución

Se obtiene por la aplicación de la fórmula : $D = \frac{V}{C}$

D = Dilución deseada

C = Cantidad a diluir

V = Volúmen deseado.

Ejemplo: para preparar 80 cc. de una dilución 1/50 de cloruro de Sodio.

$$D = 50 \quad ; \quad V = 80 \quad ; \quad C = x \quad . \quad 50 = \frac{80}{x} = 1'6$$

Tomaremos 1'6 gr. de ClNa en 80 cc. de agua para cumplir las condiciones pedidas.

Obtención de una dilución a partir de otra dilución

Por aplicación de la fórmula : $\frac{\text{Dilución que tenemos}}{\text{Dilución que queremos}} = \text{Cantidad que}$

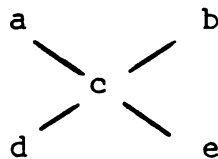
debemos tomar de la dilución que tenemos y que es necesario completar con el diluyente hasta la unidad.

Ejemplo: La dilución 1/50, preparada como precedente descrito, queremos transformarla en una dilución a 1/100.

$\frac{50}{100} = 0'5$ Tendremos que tomar 0'5 cc. de la dilución 1/50 y completarle a 1 cc. para obtener la dil. 1/100 pedida.

Obtención de una dilución por mezcla de dos diluciones

Se formará una X en la que consideraremos cinco puntos; a, b, c, d y e.



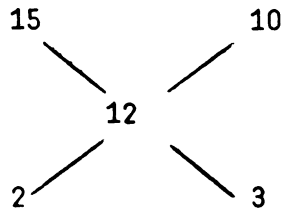
a y b son las diluciones que tenemos, consideradas en tanto por ciento estas diluciones pueden ir desde 0% en caso de producto puro, al 100% en caso del diluyente.

c representa el % deseado.

$e = a - c$; y $d = b - c$. Representan respectivamente las cantidades de b y de a para mezclar.

Ejemplo:

Tenemos dos diluciones una a 15 % y otra a 10% y queremos obtener una a 12%.



La dilución a 12% se obtiene mezclando 2 cc. de 15% a 3 cc. de 10%.

ANEXO VIII

Diversos:

Ornithodoros;

Clasificación

Ciclo Evolutivo

Imágen de Perfil

Imágen Dorsal

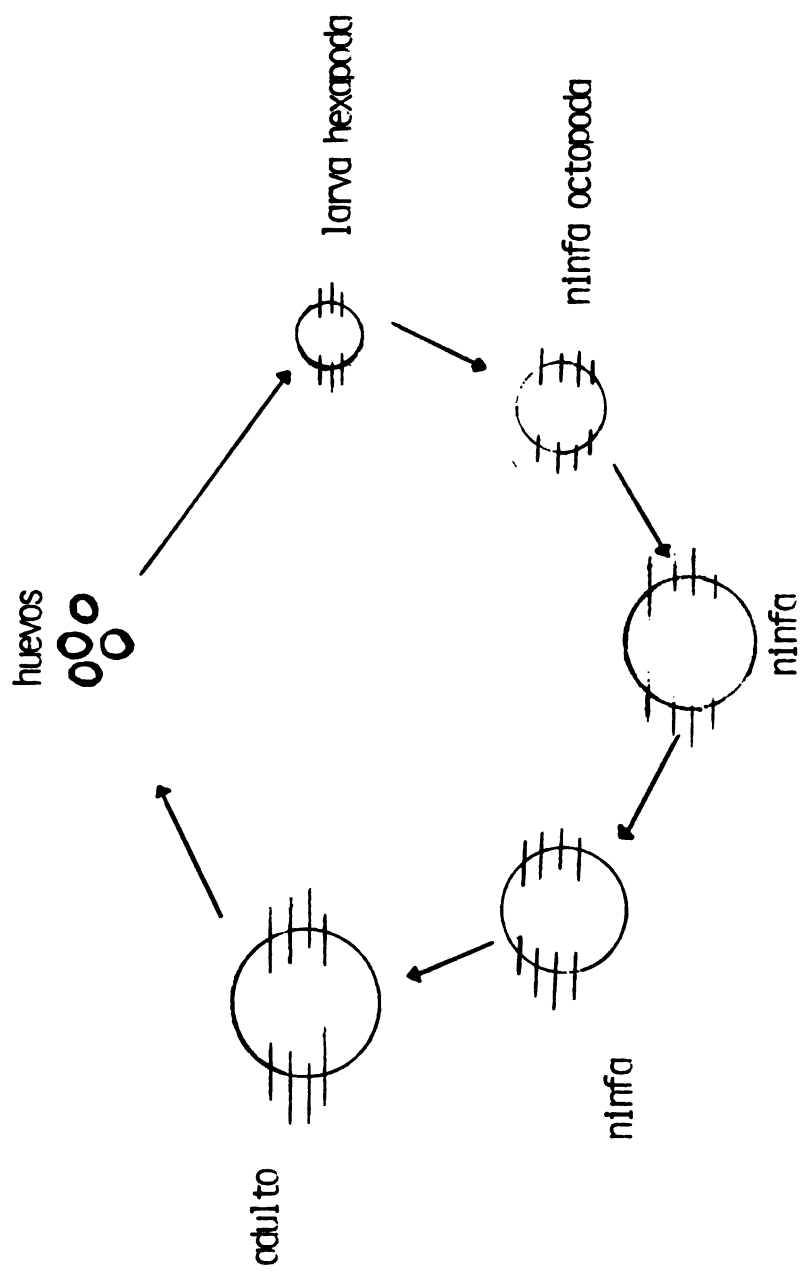
Imágen Ventral

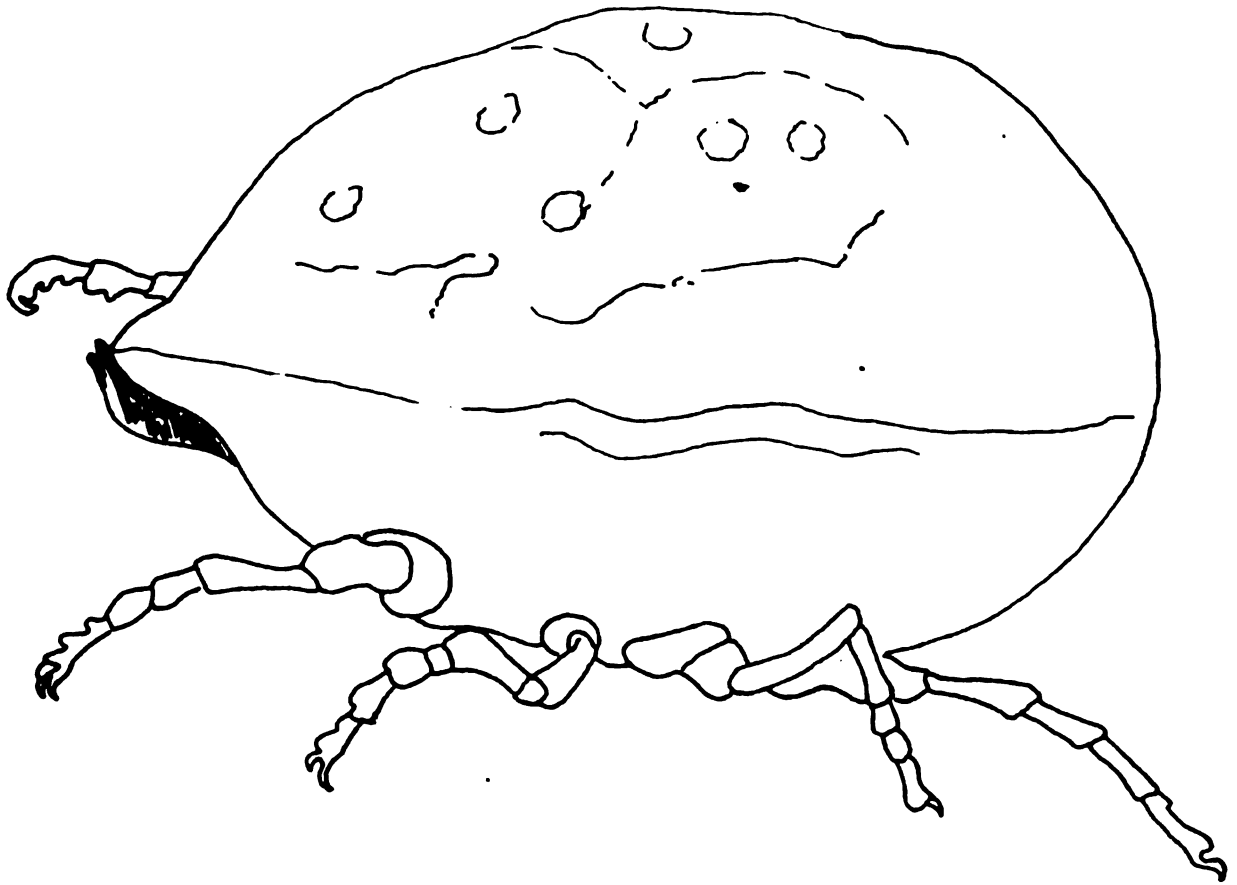
ORNITHODORUS -- CLASIFICACION

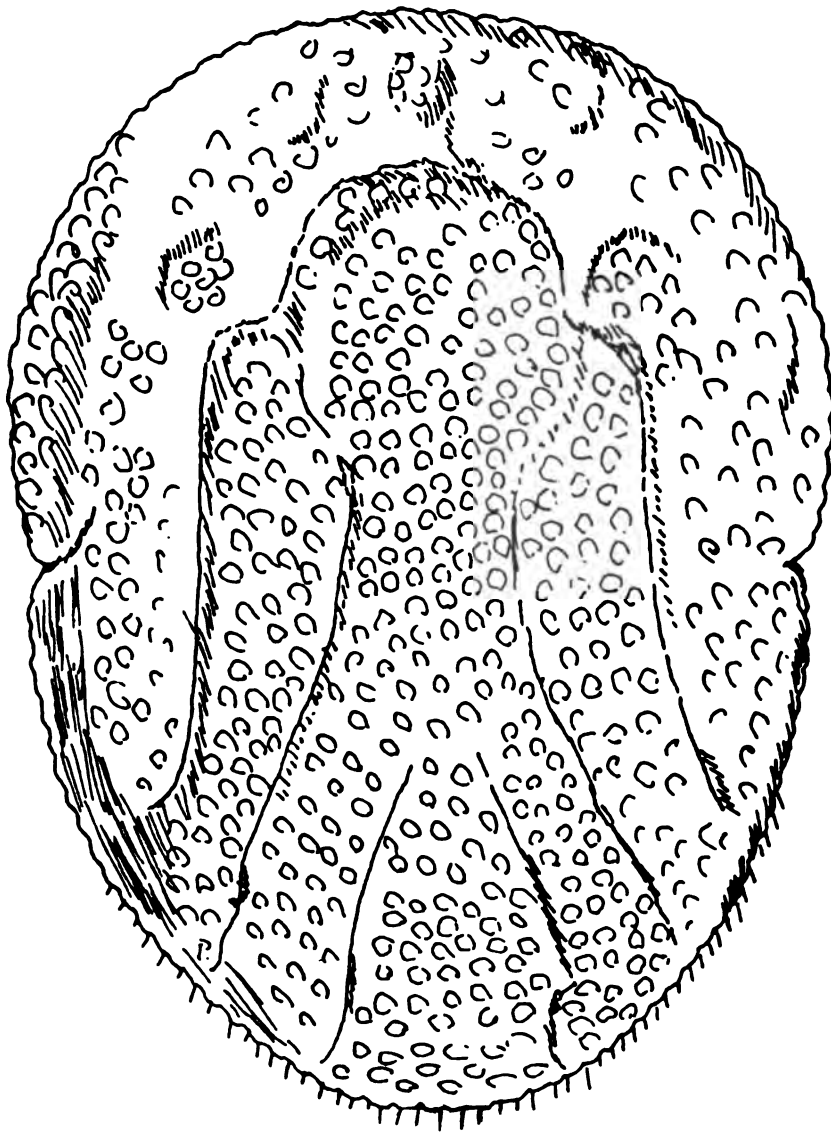
Clase	Orden	Sub Orden	Familia	Genero	Especie
A R A C H N O I D E A	A C A R I N A	sarcoptidea			
		Ixodoidea	Ixodidae		
			argasidae	argas	erraticus moubata
				ornitho dorus	

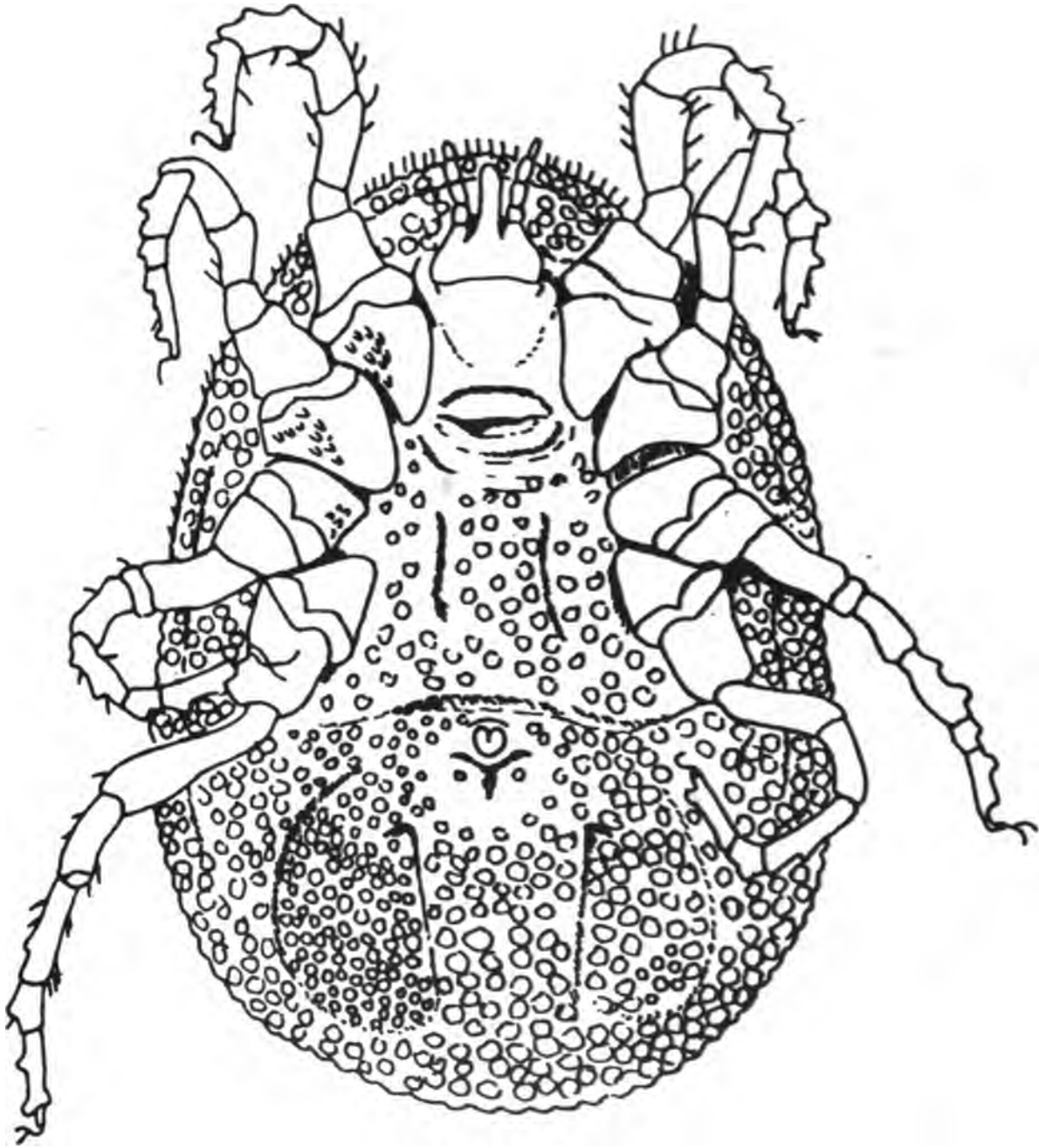
ORNITHODORIDAE

CICLO EVOLUTIVO











BIBLIOGRAFIA.

INDICE BIBLIOGRAFICO

ADLINGER H.K. , STONE S.S., HESS W. RO. & BACTLRACH H.S.

Extraction of deoxy-ribo-nucleid acid from A.S.F.V.

Virology, 1966, 30, 750 - 752

ALMEIDA J.D., WATERSON A.P. & PLOWRIGHT W.

The morphological characteristics of A.S.F.V. and its resemblance to Tipula Iridescent Virus.

Arch. ges. Virusforsch, 1967, 20, 392 - 396.

ANONIMO

Récentes indications en matiere de diagnostic de la P.P.A.

Bull. Off.Int. Epizoot., 1960, 53, 1552 - 1554.

ANONIMO

Peste Porcina Africana.

Vull. Off. Int. Epizoot., 1960, 53, 1348 - 1351.

ANONIMO

P.P.A. dans la Péninsule Ibérique.

Bull. Off. Int. Epizoot., 1960, 53, 1146 - 1149.

ANONIMO

Schweinepest bedroht Europa.

Blaue Hefte, 1961, 2, 467.

ANONIMO

Résumé des travaux de la partie de la conférence consacrée a la P.P.A.
Bull. Off. Int. Epizoot., 1961, 55, 215 - 222.

ANONIMO

Two diseases four names
J. Amer. Vet. Med. Ass., 1961, 139, 692.

ANONIMO

Schlussfolgerungen der 2. Konforenz der standigen kommissionen des OIT II.
Bull. Off. Int. Epizoot., 1963, 59, 2035 - 2037.

ANONIMO

A.S.F. in Frankreich festgestellt.
Dtsch. Tierarztl. Wschr., 1964, 71, 213.

ANONIMO

Die Wichtigsten punkte aus der verordnung zum schutze gegen die A.S.F.
Dtsch. Tierarztle. Wschr., 1964, 71, 622.

ANONIMO

Compte rendu de la réunion d'étude sur la P.P.A. dans le su-ouest européen.
Bull. Off. Int. Epizoot., 1964. 62, 1412 - 1413.

ANONIMO

F.A.O./ O.I.E. International meeting on P.P.C. and P.P.C. Roma.
Bull. Off. Int. Epizoot., 1965, 63, 915 - 916.

ANONIMO

Réunion de consultation et d'information de l'O.I.E. sur la peste porcine
Bull. Off. Int. Epizoot., 1967, 67, 999 - 1034.

ANONIMO

P.P.A.

Annuaire de la Santé Animale. F.A.O./O.I.E., 1960, 215 a 227.

ANONIMO

P.P.A. COMPTE RENDU DE LA CONFERENCE F.A.O./O.I.E. Sur les maladies épidémiologiques d'actualité (Ankara).

Bull Off. Int. Epizoot., 1961, 55, 1278-1280.

ANONIMO

P.P.A. CARTE DE LA REPARTITION GEOGRAPHIQUE Des maladies en Afrique.

Bull. Epiz. Dis. Afr., 1961, 9, 275

1962, 10, 481

1964, 12, 378

ANONIMO

Liste A des maladies à déclaration obligatoire approuvée par le Comité de l' O.I.E.

Contrôle Zoosanitaire International des échanges commerciaux d' animaux et des produits animaux.

Edit. O.I.E., Paris, 1964, pags. 552 - 553.

ANONIMO

A.S.F.

Report of the administration of south west Africa of the year 1920.

ANONIMO

Conférence O.I.E./F.A.O. sur la P.P.A. Resumen de Trabajos.

Bull. Off. Int. Epizoot., 1961, 55, 215 - 222.

ANONIMO

The warthog *Phacocherus* as a carrier of the virus of A.S.F.
J.S. Afr. Vet. Med. Ass., 1931, 2 , 163

ANONIMO

The warthog as a carrier of the virus of A.S.F.
Onderstepoort, News letters No. 14, 1931

ANONIMO

P.P.A. au Portugal.
Bull. Off. Int. Epizoot., 1957, 47. 504

ANONIMO

P.P.A. en la Península Ibérica.
Bull, Off. Int. Epizoot., 1960, 53, 1146 - 1149.

ANONIMO

Laboratory Manual for research on Classical And African Swine Fever.
Publication C.E.F., Eur.

ANONIMO

Laboratory Manual for Research on Classical and African Swine Fever.
Publication C.E.F., 1976, Eur. 5487, 73 - 150

ANONIMO

Studies on A.S.F.V. Purification and Analysis of Virions.
Publication C.F.F., Eur., 1977 5626 e, 1 - 68

ANONIMO

P.P.C. and P.P.A. (Etiología, Epizootiología, Inmunología, Patogenia y
Diagnóstico)
Publication C.F.F., Eur., 1977, 5904 en, 469 - 681 y 724- 729.

RAMNISTFR G.L. , GRAY D.P., BOULANGER P. & WILLIS N.C.

I - Antiserum Production A.S.F.

Canad. J. Comp. Med. Vet. Sci., 1967, 31, 2 - 6

BEATON W.G.

A.S.F.

Brit. Vet. J., 1961, 117, 517 - 518 y 553

BEAUMONT E.

A.S.F.

Kenya Veterinary Department. Annual Report 1950, 1952, 6

BELLER K. & BIELING R.-

A.S.F.

Die Viruskrankheiten der Haus und Laboratoriumstiere, ihre Bekämpfung.
Leipzig, 1950.

BLACK D.N. & BROWN F.

Purification and Physico-chemical characteristics of A.S.F.

Jour. of Gen. Virology, 1976, 32, 509-518.

BLACK D.N. & BROWN F.

Purification and Physico-chemical characteristics of A.S.F.V.

Publication C.E.E., Fur., 1977, 5904 en, 483 - 499

BOLDPINI C.

La P.P.A. in Europa.

Vet. Ital. 1967, 18, 238 - 261.

BOOL P.H.

De Diagnostiek van de Afrikaanse Varkenpest.

Tijdschr. Diergeneesk., 1964, 89, 1882 - 1886

BOOL P.H., ORDAS A. & SANCHEZ BOTIJA C.

El diagnóstico de la P.P.A. por inmunofluorescencia.

Bull. Off. Int. Epizoot., 1969, 72, 819 - 839

BOTIJA C.

Ver Sánchez Botija, C.

BOULANGER P., BANNISTER G.L., GREIG A.S., GRAY D.P., RUCKERBAUER G.M.

Diagnosis of A.S.F. by Immunofluorescence and others serological methods.

Bull. Off. Int. Epizoot., 1966, 66

BOULANGER P., BANNISTER G.K., GRAY D.P., RUCKERBAUER G.M. & WILLIS N.G.

A.S.F. -II Detection of the virus in swine tissues by means of the modified direct complement-fixation test.

Canad. J. Comp. Med. Vet. Sci., 1967, 31, 7 - 11

BOULANGER P., BANNISTER G.L., GRAY D.F., RUCKERBAUER G.M. & WILLIS N.G.

A.S.F. -III- The use of the agar double-diffusion precipitation test for the detection of the virus in swine tissue.

Canad. J. Comp. Med. Vet. Sci., 1967, 31, 12 - 15.

BOULANGER P., BANNISTER G.L., GREIG A.S., GRAY D.P., RUCKERBAUER G.M. & WILLIS N.G.-

A.S.F. - IV- Demonstration of the viral antigen by means of immunofluorescence.

Canad. J. Comp. Med. Vet. Sci., 1967, 31, 16 - 23.

BRACO FORTE M.C., MENDEZ A.M. & BRANCO A.A.

Ocorencias vacinais e pos-vacinais em suínos imunizados contra a peste suína atípica ou virose L. Aspectos anatomopatológicos e etiopatogénicos.

Ann. Escola Med. Vet. Lisboa., 1963, 5, 65 - 87.

BRACO FORTE M.C., MENDEZ A.M. & BRANCO A.A.

Aspectos actuais da patologia suina em Portugal.

Rev. Cienc. Vet. Lisboa, 1964, 59, 45 y 185 - 239.

BRIESE S.S. & DE BOER C.J.

Electron microscope observations of A.S.F.V. in tissue culture.

Cells Virology, 1966, 28, 420 - 428.

BRIESE S.S. & HESS W.R.

Electron microscopy of A.S.F.V., Hemadsorption.

J. Eact., 1966, 92, 272 - 274.

BRIESE, JUN, DE BOER.

Chemical Structure of A.S.F.V. investigated by electron microscopy.

J. Gen. Virology, 1967, 1, 251 - 252.

BRIESE, JUN & DE BOER

Effects of Hydroxyurea on the development of A.S.F.V.

Am. J. Path., 1969, 55, 66 - 77.

CARNEIRO R., LAFNAUDIE B., RUIZ GONZALVO F. & HAAG J.

P.P.A. Etudes sur la réaction d'hémadsorption et son inhibition par des anticorps spécifiques.

Rec. Méd. Vét., 1967, 143, 49 - 59.

CARNEIRO R., LUCAS A., RUIZ GONZALVO F. & LAFNAUDIE B.

P.P.A. Application de l'Immunofluorescence a l'étude du virus de la P.P.A. sur les cultures de tissu.

Rec. Méd. Vét., 1968, 144, 937 - 949.

CARNERO R., GAYOT G., PLATEAU E., COSTES C. & DELCLOS G.

Données épidémiologiques, symptomatologiques et anatomopathologiques, collectées en France en 1974, et pouvant servir de base au diagnostic clinique.

Bull. Soc. Sci. Vét. et Méd. Comparée, 1974, 76, 349 - 358.

CARNERO R. COSTES C. & PICARD M.

Multiplication du virus de la Maladie d'Aujeszky sur la culture de leucocytes isolés du sang de porc.

Bull. Off. Int. Epizoot., 1975.

CARNERO R., COSTE C. & PICARD M.

P.P.A. Etude clinique et de laboratoire de l'onde épizootique de Janvier, Mars 1974.

Compte rendu Congrès Mondial Vétérinaire (Thessalonique).
1975, pages 2201- 2203.

CARNERO R. , COSTES C. & PICARD M.

A.S.F. Study on some aspects of the diagnosis for viral identification and detection of antibodies.

Publication C.EF (Eur), 1977, 5904en, 669 - 680.

CARNERO R., COSTES C. & PICARD M.

A.S.F. A contribution to the pathogenesis and immunology

Publication C.F.E. (Eur), 1977, 5904 en, 591 - 601.

CASTRO PORTUGAL F.L., MOURA NUNEZ J.F., ALVES DE MATOS A.P.

VIGARIO J.D. & FERREIRA C.A.

Detection of A.S.F. antigens in cell cultures by the immunoperoxidase technique in light and electron microscopy.

Publication C.F.F. (Eur), 1977, 5904 en, 635 - 641.

CECCARELLI A., AGRIMI P. & DEL MAZZA I.

Diagnosi sperimentale della P.S.A.

Zooprofili-si, 1968, II - III, 91 - 118

COGGINS L.

Growth and certain stability characteristics of A.S.F.V.

Amer. J. Vet. Res., 1966, 27, 1351 - 1358.

COGGINS L. & HEUSCHELE W.P.

Use of agar diffusion precipitation test in the diagnosis of A.S.F.V.

Amer. J. Vet. Res., 1966, 27, 485 - 488.

COGGINS L.

A modified hemadsorption - inhibition test for A.S.F.V.

Bull. Epizoot. Dis Afr., 1968, 61 - 64.

COGGINS L.

Segregation of a non-haemadsorbing A.S.F.V. in tissue culture.

Cornell Vet. 1968, 58, 12 - 20.

COLGROVE S.

Immunofluorescence and inclusion bodies in circulating leucocytes of pigs infected with A.S.F.V.

Bull. Epiz. Dis. Afr., 1968, 16, 341 - 343.

COLGROVE S.

Diagnosis of A.S.F. by fluorescent antibody staining of blood films and buffy coat smears.

Bull. Epiz. Dis. Afr., 1968, 17, 39 - 44.

- COLGROVE S., HAELTERMAN E.O. & COGGINS L.
Pathogenesis of A.S.F. in young pigs.
Amer. J. Vet. Res., 1969, 30, 1343 - 1359.
- CONCEICAO MONTEIRO J.
Peste Suina em Angola.
Pecuaria, 1947, 1, 217 - 145.
- CONCELLON MARTINEZ D.A.
El problema de la Peste Porcina.
An. Col. Ofic. Vet. Prov. Barcelona, 1964, 21, 261 - 309.
- COSTES C., CARNERO R. & GAYOT G.
P.P.A. Diagnostic au laboratoire, technologie et résultats obtenus
sur les cas observés en France au début de l'année 1974.
Revue Méd. Vét., 1974, 125, 1119 - 1130.
- COWAN K.M.
Immunological studies on A.S.F.V. -I Elimination of the procomplementa-
ry activity of Swine serum with formalin.
J. Immun., 1961, 86, 465 - 470.
- COWAN K.M.
Immunological studies on A.S.F.V. -II Enhancing effects of normal bovine
serum on the complement-fixation reaction.
Amer J. Vet. Res., 1964, 24, 756 - 761.
- COX B.F. & HESS W.R.
Note on an A.S.F. investigation in Nyasaland.
Bull. Epiz. Dis. Afr., 1962, 10, 439 - 440.

COX B.F.

S.S.F.

Bull. Epiz. Dis. Afr., 1963, 11, 147 - 148.

CURASSON G.

Peste porcine de l'Est Africain. Traite de pathologie exotique vétérinaire.

Vigot Editeur, Paris, 1942, 1, 208-211.

DALSGAARD K., OVERBY E. & SANCHEZ BOTIJA C.

Crossed immuno-electrophoretic characterisation of virus specified antigens in cells infected with A.S.F.V.

Publication C.E.E. (Eur), 1977, 5904 en, 500 - 506

DASCALOS A.M. & MENDEZ A.M.

Apontamentos sobre a leporizacao do virus da P.P.A.

Rev. Cienc. Vet. Lisboa, 1962, 59, 35 - 56

DAVIDOV V. Ja.

Lesiones histológicas de la P.P.A. (en lengua rusa)

Tav. Allunionsinst Ecp. Vet. Med., 1962, 29, 209 - 216.

DE BOER C.J.

Studies to determine neutralizing antibody in sera from animals recovered from A.S.F. and laboratory animals inoculated with african virus with adjuvants.

Arch. Virusforsch (Wien), 1967, 20, 164-179.

DE BOER C.J., HESS W.R. & DARKIRI A.H.

Studies to determine the presence of neutralizing antibody in sera and kidneys from swine recovered from A.S.F.V.

Arch. Gesante Virusforsch, 1969, 27, 44 - 54.

DELAY P.D. & CARBREY E.A.

Experimentally induced hog cholera in pigs immunized with A.S.F.
Proc. , U.S. Livestock sanit. Ass., 1964, 87, 170 - 176.

DELAY P.D.

Effect of stress on pig inoculated with attenuated A.S.F.V.
Reunion international F.A.O./O.I.E., Roma, Junio de 1965.

DELAY P.D. & SHARMAN E.C.

The effect of stressor viruses on pigs inoculated with attenuated
A.S.F.V.
Bull. Off. Int. Epizoot., 1965, 63, 733 - 749.

DE TRAY D.E.

A.S.F. A review.
Bull. Epiz. Dis. Afr., 1957, 130, 537 - 540

DE TRAY D.E.

A.S.F. in warthogs(Phacochoero)
J. Amer. Vet. Med. Ass., 1957, 130, 537 - 540.

DE TRAY D.E.

Persistence of viremia and immunity in A.S.F.
Amer. J. Vet. Res., 1957, 18, 811- 816.

DE TRAY D.E.

A.S.F. An interim report.
Bull. Epiz. Dis. Afr., 1960, 8, 217 - 223.

DE TRAY D.E.

A.S.F.
J. Amer. Vet. Med. Ass., 1961, 139, 1230 - 1232.

DE TRAY D.E.

A.S.F.

Avanc. Vet. Sci., 1963, 8, 299 - 333.

DE TRAY D.E. & SCOTT. G.R.

The effect of hyper-immune hog cholera serum on the virus of A.S.F.

J. Amer. Vet. Med. Ass., 1955, 126, 313 - 314.

DE TRAY D.E. & SCOTT G.R.

Blood changes in swine with A.S.F.

Amer. J. Vet. Res. 1957, 18, 484 - 490.

DE TRAY D.E. , ZAFHIRO D. & HAY D.

The incidence of A.S.F. in wart hogs in Kenya.

J. Amer. Vet. Med. Ass., 1961, 138, 78 - 80.

DIAZ MONTILLA R. & SANCHEZ BOTIJA C.

La evolución de la P.P.A. en España 1965 - 1966.

Bull. Off. Int. Epizoo., 1966, 66, 707 - 709.

DONATIEN A. & LESTOQUARD. F.

Sur une maladie nouvelle du porc.

Bull. Acad. Vét. France, 1939, 12, 289 - 301.

DONE J.D.

The pathological differentiation of diseases of the central nervous system of the pig.

Vet. Rec., 1957, 69, 1341 - 1349.

DOYLE T.M.

African pig disease.

Brit. Vet. J. 1961, 117, 229 - 238 y 552.

DRAGER K., KAMPHANS S. & WIEGAND D.

Zur frage der spzifitat des hemadsorptionstestes bei der A.S.F.
Tierarztl Umsch., 1965, 20, 123 - 131.

DUNNE H.W. , LUEDKE A.J., REICH C.V. & HOKANSON J.F.

The in vitro growth of hog cholera virus in cells of peripheral blood.
Amer. J. Vet. Res., 1957, 13, 287 - 289.

DUNNE H.W., LUEDKE A. J., REICH C.V. & HOKANSON J.F.

The growth of animal leucocytes and their use in the cultivation of
animal viruses.
Amer. J. Vet. Res., 1958, 19, 706 - 711.

ELMS.

Negative staining of a non hemadsorbing strain of A.S.F.
Onderstepoort. J. Off. Vet. Res. 1977, 44, 39 - 45.

ENJUANES L. , CARRACOSA & VINUELA E.

Isolation and properties of the ADN of A.S.F.
J. Gen. Virology, 1976, 32, 479-492.

FRITSCHI E.

Die africanische schwine pest und pferdepest.
Schweiz Arch. Tierheilk, 1961, 106. 153 - 156.

GAGO DACAMARA N.J.

Historia da peste suina en Angola
Pecuaria, 1947 - 1948, pags. 25 - 40

GASSE H.

Measures for preventing the introduction of A.S.F. into France.
Bull. Off. Int. Epizoot., 1963, 59, 1867 - 1872

GAYOT, G., CARNERO, R., COSTES, C., PLATEAU, E., DELCLOS, G. & CAZAUBON, P.
 P.P.A. - Isolement et identification en France métropolitaine. Données
 épidémiologiques, cliniques, anatomopathologiques et de laboratoire.
 Bull. Acad. Vét. France, 1974, 47, 91-97

GEIGER, W.

Virusschweinepest und afrikanische virusseuche der schweine.
 Habil, Schrift, Hannover 1937.

GEIGER, W.

Schweinepest und virusseuche der schweine in Africa
 Dtsch. Tierarzt Wschr., 1941, 49, 145-148

GEIGER, W.

Die africanische virusseuche der schweine.
 Dtsch. Tierarztl Wschr., 1947, 54, 162-164 7 177-178

GEIGER, W.

Der derzeitige Stand unserer kenntnisse uber die afrikanische virusseuche
 der schweine.
 Itsch. Tierarztl, Wschr, 1961, 68, 384-388

GILBER Y. & MONNIER J.

P.P.A. Rapport sur le fonctionnement du Laboratoire National del l'Elevage
 du Sénégal.
 Rapport, 1962, pages 96-97

GORET P. & PILET, C.

Une menace por le cheptel porcin français; la maladie de Montgomery (PPA)
 Cah. Méd. Vét., 1961, 30, 69-86

GORET, P.

P.P.A.
 Veterinarian G.B., 1964, 2, 291

GREIG A.S., BOULANGER, P., & BANNISTER G.L.

A.S.F.V. Cultivation of the virus in primary pig kidney cells.

Canad. J. Com. Med. Vet.Sci. 1967, 31, 24-31

GREIG A. & PLOWRIGHT W.

The excretion of two virulent strains of A.S.F.V. by domestic pigs.

J. of Hygiene, 1970, 68, 673-682.

GREIG A.

Pathogenesis of A.S.F. in pigs naturally exposed to the disease.

J. of Comp. Pathology, 1972, 82, 73-79.

HAAG J.

Evolución de la P.P.A. en España.

Encyclo. Vet., 1964, 21, 168-171-

HAAG J., LARNAUDIE B., & RUIZ GONZALVO F.

P.P.A. Action de la 5-iodo 2' desoxyuridine sur la culture du virus in vitro.

Bull. Off. Int. Epizoot. 1965, 63, 717-722.

HAAG J. & LARENAUDIE B.

P.P.A. L'effet cytopathogene du virus en culture leucocytaire.

Bull. Off. Int. Epizoot. 1965, 63, 191-198.

HAAG J., LARENAUDIE B. & LUCAS A.

Le diagnostic expérimental de la P.P.A.

Bull. Off. Int. Epizoot., 1965, 63, 143-162.

HAGG, J. & LARENAUDIE, B.

P.P.A. Réaction d'hémadsorption. Standardisation de la technique de Tubiash pour les cultures leucocytaires.

Bull. Off. Int. Epizzot., 1965, 63, 163-167

HAGG, J., LUCAS, B., LARENAUDIE, B., RUIZ GONZALVO, F. & CARNERO, R.

P.P.A. Recherches sur la taille et la morphologie du virus.

Rec. Méd. Vét., 1966, 142, 801-808

HESS, W.R. & DE TRAY, D.E.

The use of leucocyte culture for diagnosing A.S.F.

Bull. Epiz. Dis. Afr., 1960, 8, 317-320

HESS, W.R. & DE TRAY, D.E.

Empleo de cultivos de leucocitos para el diagnóstico de la P.P.A.

Bull. Off. Int. Epizoot., 1961, 55, 210-214

HESS, W.R., COX, B.F., HEUSCHELE, W.P. & STONE S.S.

Propagation and modification of A.S.F.V. in cell cultures.

Amer. J. Vet. Res., 1965, 26, 141-146

HESS, W.R.

A.S.F.V.

Virology Monograph, 1971, 9, 1-33

HESS, W.R. & PAN, IC.

The immune response in A.S.F.V.

Publication C.E.E. (Eur), 1977, 5904 en, 602-611

- HEUSCHELE, W.P. & COGGINS, L.
Isolation of A.S.F.V. from a giant forest hog.
Bull. Epiz. Dis. Afr. , 1965, 13, 255-262
- HEUSCHELE, W.P., COGGINS, L., & STONE S.S.
Flourescent antibody studies on A.S.F.
Am. J. Vet. Res., 1966, 27, 477-484
- HEUSCHELE, W.P., STONE S.S. & COGGINS, L.
Observations on the epizootiology of A.S.F.
Bull. Epiz. Dis. Afr., 1965, 13, 157-160
- HEUSCHELE, W.P. & COGGINS, L.
Studies on the transmission of A.S.F.V. by arthropods.
Proc. 69th Ann. Meet. US. Livestock Sanit. Ass. 1965
pages 94-100.
- HEUSCHELE, W.P.
Studues on the pathogeneses of A.S.F. - I Quantitative Studies on the
Sequential development of virus in pig tissues.
Arch. Virusforsch (Wien), 1967, 21, 349-356
- HUSEL L. & LIEBISCH H.
Die Afrikanische Schweinepest, eine gefahr fur die europaische
viehwirtschaft.
Beitr. Trop. Landw. Tropenveterinarmed, 1963, 1, 138-148
- INNES J.R.M. & SAUNDERES, L.Z.
A.S.F. Comparative neuropathology
Academic Press., N.W., Lon. 1962.

JANOWSKA I.

Comparison de deux souches de P.P. au moyen de l'interférence avec le virus grippal en culture cellulaire.

Ann. Inst. Pasteur, 1960, 99, 792-798

JASTRZEBSKI, T.

La P.P.A.

Med. Vet. Lublin, 1962, 18, 193-197.

JOHNSON C.C. & LONG J.D.

Heat treatment of garbage to control disease.

Vet. Med. 1953, 48 13-14

KAMPHANS, S.

Über den stand der afrikanischen Schweinespest in Spanien.

Tierarztl. Umsch., 1963, 18, 538-540

KAMPHANS, S.

Sektionsbericht über fälle von afrikanischer Schweinepest.

Dtsch. Tierarztl. Wschr., 1965, 72, 28-29

KORN, G.

Über die afrikanische Schweinepest und die spezifität des hamadsorptionstestes zu ihrer diagnose.

Mh. Tierheilt., 1963, 15, 225-232.

KOVALENKO J.R., IVANOV, B.G., HAKHIN, A.G. & ISAENKO, E.P.

Experimental infection of pigs with A.S.F.V.

Trudy vsesoyuz Inst. Eksp, 1961, 24, 53-61

KOVALENKO, J.R.

P.P.A.

Veterinariya, Moscou, 1962, 39, 75-79

KOVALENKO , JR. BURBA, LG. & SIDOROV M.A.

Pathological and anatomical changes observed in A.S.F.
Veterinariya, Moskva, 1964, 41, 53-40

KOVALENKO, J.R., SIDOROV, M.A. & BURBA, L.G.

Use of leucocyte culture for the differentiation of viruses of P.P.A.
and P.P.C.
Ioklad. Akad. Selsk Nauk Imeni Lenina, 1964.

KOVALENKO, J.R., SIDOROV, M.A. & BURBA, L.G.

Experimental investigation on A.S.F.
Bull. Off. Int. Epizoot., 1965, 63, 169-189

KOVALENKO, J.R., SIDOROV, M.A. & BURBA, L.G.

Clinical picture of experimental A.S.F.
Veterinariya, Moskva, 1965, 42, 40-43

KOVALENKO, J.R., SIDOROV, M.A. & BURBA, L.G.

La P.P.A. et les moyens de lutte.
Internation, Z. Landwirtsch. Dtsch., 1965 pages 47-52

KOVALENKO, J.R.

L'état actuel de nos connaissances sur la P.P.A.
Trudy. Vses. Inst. Eksp. Vet., 1962, 29, 177-199

KOVALENKO J.R., BURBA, LG. & SIDOROV, M.A.

Survie du virus de la P.P.A. dans différentes conditions de milieux.
Vestnik sel'sk. Nauk, 1964, 3, 62-65

KOVALENKO, J.R. BURBA, L.G. & SIDOROV, M.A.

Les signes cliniques et les lésions des chevres infectées par le virus de la P.P.A.

Dokl. Vses. Akad. Sel'sk. Nauk., 1966, 8, 28-31

KOVALENKO J.R., BURBA L.B. & SIDOROV, M.A.

Les signes cliniques et les lésions des lapins infectés par le virus de la P.P.A.

Dokl, Vses, Akad. Sel'sk Nauk, 1966, 12,30-33

KOVALENKO J.R., SIDOROV M.A. & BURBA L.G.

Propriétés biologiques du virus de la P.P.A.

Dolk, Vses. Akad. Sel'sk Nauk., 1964, 1, 35-40

KOVALENKO J.R., SIDOROV, M.A. & BURBA L.G.

Les voies d'infection du virus de la P.P.A. chez le porc.

Trudy Vses. Inst. Eksp, Vet., 1965, 31, 336-342

KOVALENKO J.R., SIDOROV M.A. & BURBA L.G.

Importance diagnostique de la réaction de l'amylose dans la P.P.C. et la P.P.A.

Trudy. Vses. Inst. Eksp. Vet., 1965, 31, 343-346

KRJUKOV N.N., SJURIN V.N., ZORINA N.R., SORVACEVA, Z.L. & SURIN V.I.

Le diagnostic de la P.P.A. par la réaction de H.A.D. en cultures de leucocytes.

Veterinariya, Moskva, 1965, 42, 10-22

LARENAUDIE, B.

Diagnostic P.P.C. et P.P.A.

Rec. Méd. Vét., 1964, 140, 999-1003

LARENAUDIE, B., HAAG J. & LACAZE B.

La P.P.A.

Encyclo. Vét., 1964, 21, 172-177

LARENAUDIE B., HAAG J. & LACAZE B.

Identification en France Métropolitaine de la P.P.A.

Bull. Acad. Vét. Fr., 1964, 37.

LARENAUDIE, B., HAAG J. & CARNERO R.

La purification du virus de la P.P.A. par le fluorocarbone.

Bull. Off. Int. Epizoot. 1965, 63, 711-716.

LARENAUDIE B., HAAG J., CARNERO R. & RUIZ GONZALVO, E.

Etude des propriétés biologiques et chimiques du virus de la P.P.A. en cultures de leucocytes.

Rec. Méd. Vét., 1966, 903-919

LARENAUDIE B., TOULIER, M.C., SANTUCCI J. & CARNERO R.

Etude en microscopie électronique de l'hémadsorption provoquée par le virus de la P.P.A.

Rec. Méd. Vét., 1967, 143, 925-935

LETTE VELHO E.

Observations sur la P.P.A. en Angola

Bull. Off. Int. Epizoot. 1956, 46, 335-340.

LETTE VELHO E.

La P.P.A.

Bull. Off. Int. Epizoot. 1957, 48 395-402.

LOBRY M.A.

Existence chez les animaux sauvages en Afrique de cas de maladies infectieuses des animaux domestiques.

Bull. Epiz. Dis. Afr. 1964, 12, 43-66

LOAN R.W. & GUSTAFSON, D.P.

Cultivation of Hog Cholera virus in subculturable swine buffy coat cells.

Amer. J. Vet. Res., 1961, 22, 741-745.

LUCAS A., HAAG, J. & LARENAUDIE, B.

Les procédures du diagnostic de laboratoire utilisées en France a l'égard des pestes porcines.

Bull. Off. Int. Epizoot., 1965, 63, 723-731

LUCAS, A., LARENAUDIE B., HAAG J, CARNERO, R. & RUIZ GONZALVO, F.

Essai de calssification du virus de la P.P.A.

Rec. Méd. Vét. 1966, 142, 1065-1068

LUCAS A., & CARNERO R.

Situation du virus de la P.P.A. dans la systématique virale.

Comp. Rendu de l'Acad. de Sci. de Paris, 1968, 266, 1800-1801.

LUCAS A, HAAG J. & LARENAUDIE, B.

P.P.A.

L'Expansion Editeur, 1967.

MALMQUIST, W.A. & HAY D.

Hemoadsorption and cytopathic effect produced by A.S.F.V. in swine bone marrow and buffy coat cultures.

Amer. J. Vet. Res. 1960, 21, 104-108.

MALMQUIST, W.A. & HAY D.

Efecto citopático y de hemadsorción producido por el virus de la P.P.A. en cultivos de médula ósea de cerdo y de leucocitos.

Bull. Off. Int. Epizoot. 1961, 55, 193-200.

MALMQUIST W.A.

Propagation, modification and hemadsorption of A.S.F.V. in cells cultures.

Amer. J. Vet. Res., 1962, 23, 241-247

MALMQUIST W.A.

Serologic and immunologic studies with A.S.F.V.

Amer. J. Vet. Res., 1963, 24, 450-459

MANNIGER R., & MOCSY J.

Afrikanische Schweinepest.

Spezielle pathologie und therapie der haustiere. Gustav Fischer verlang.

Iena. 1954, 1, 223

MANSO RIBEIRO J.

Adaptation du virus P.P.A.

Bull. Off. Int. Epizoot., 1961, 56, 1212-1214

MANSO RIBEIRO J.

Declaration sur la vaccination contre la P.P.A.

Bull. Off. Int. Epizoot., 1962, 58, 1031-1040.

MANSO RIBEIRO J.

Etude de la valeur specifique de l'epreuve de hemadsorption dans le diagnostique de la P.P.A.

C.R. Symposium Virologie Veterinaire OIE/AISM. LYON 1962, 1, 39-42.

MANSO RIBEIRO J., ROSA AZEVEDO J.A., TEIXEIRA M.J.O. BRACO FORTE, MC.
RODRIGUEZ RIBEIRO A.M., OLIVEIRE E. NORONHA, F., GRAVE PEREIRA, C. &
VIGARIO J.D.

Peste Porcine provoquee par une souche differente (souche L.) de la
souche clasique.

Bull. Off. Int. Epizoot., 1958, 50, 516-534

MANSO RIBEIRO J. & ROSA AZEVEDO J.

Reaparition de la P.P.A. au Portugal

Bull. Off. Int. Epizoot., 1961, 55, 88-106.

MANSO RIBEIRO J., NUNES PETISCA J.L., LOPES FRAZAO F. & SOBRAL M.

Vaccination contre la P.P.A.

Bull. Off. Int. Epizoot. 1963, 60, 921-937.

MARTINS MENDES A.

Primera tentativa de preparacao de una vacina contra a P.P.A. en
Angola.

Pecuaria, 1953, 46

MOURA NUNES J.F., VIGARIO, J.D. & TERRINHA

Ultrastructural study of A.S.F. replication in cultures of swine bone
marrow cells.

Archiv of Virology, 1975, 49, 59-66.

MOURA NUNES J.F., VIGARIO J.D., CASTRO PORTUGAL F.L. FERREIRA, C. & ALVES
DE MATOS A.P.

Structure of A.S.F.V.

Publication C.E.E. (Eur) 1977, 5904 en. 543-556

A.S.F. Diseases of Swine edited by H.W. Dunne, Ames, Iowa, U.S.A.

Edit. 1964, 1 187-202

MAZZARACHIO

L'episode de P.P.A. en Italie

Am. Inst. Super. Sanita. 1968, 4, 650-673

MCINTOSH B.M.

The propagation of A.S.F.V. in the embrionated hen's egg.

J.S.Afr. Vet, Med. Ass. 1952, 23, 217-220.

MENDES, A.M.

Tentativa de preparacao duna vaccina cristal em Angola.

Pecuaria 1950.

MENDES A.M.

Existiria em Angola a doenca de Montgomery?

Rev. Cienc. Vet. Lisboa. 1955, 50, 306-340

MENDES A.M., & DASKALOS A.M. de O.

Studies on the lapinization of A.S.F.V. in Angola.

Bull Epiz. Dis. Afr. 1955, 3, 9-14.

MENDES A.M. & DASKALOS A.M. de O.

Algumas tentavias para a leporizacao de virus da P.P.A. em Angola.

Rev. Cienc. Vet. Lisboa. 1955, 50, 253-264.

MENDES A.M.

Considerations sur le diagnostic et la prohilaxie de la P.P.A.

Bull. Off. Int. Epizoot., 1961, 56, 408-417.

MENDES A.M.

The lapinization of the virus of A.S.F.

Bull. Off. Int. Epizoot. 1962, 58, 707-727.

MENDES A.M.

Virus da peste suina tipo africano em carnes fumadas.
Rev. Cienc. Vet. Lisboa, 1964, 59, 307-311

MOULTON J.E. & COGGINS L.

Comparison of Lesions in Acute and Chronic A.S.F.
Cornell Veterin. 1968, 58, 364-388

MOULTON, J.E. & COGGINS, L.

Synthesis and cytopathogenesis of A.S.F.V. in porcine cells cultures.
Am. J. Vet. Res., 1968, 29, 219-232.

MOULTON J.E., PAN, I.C., HESS, W.R., DE BOER C.J. & TESSLER J.

Pathological features of chronic pneumonie in pigs with experimentally
induced A.S.F.
Am. J. Vet. Res, 1975, 36, 27-32

MULHERN F.J.

The economic significance of the combined threat of cholera and A.S.F.
Bull. Off. Int. Epizoot., 1965, 63, 779-783.

NEITZ, W.O.

A.S.F.
Maladies nouvelles des animaux. Etudes agricoles de la FAO-ROMA, 1964.

NUNES PETISCA, J.L.

Etudes anatomo-pathologiques et histopathologiques sur la P.P.A. au
Portugal.
Bull. Off. Int. Epizoot., 1965, 63, 103-142.

NUNES PETISCA J.L.

Quelques aspects morphologiques des suites de la vaccination contra la P.P.A. au Portugal.

Bull. Off. Int. Epizzot., 1965, 63, 199-237.

NUNES PETISCA, J.L., & MARTIN GONZALVES J.M.

The evolution of the histopathological picture on pigs experimentally infected with acute A.S.F.

Publication C.E.E. (Eur) 1977, 5904 en. 612-627.

ORDAS A. & SANCHEZ BOTIJA C.

Differential diagnosis between A.S.F. and Ajeszky's disease in leucocyte culture.

Publication CEE. (Eur.) 1977, 5904 en. 653-657.

ORFEI Z, PERSECHINO, A., LUPINI P., & CASSONE A.

La reazione di emoadsorbimento nell'epizzozia suina africana in Italia. XXI Conv. Soc. Ital. Sci. Vet., Senigallia, 21-64.

PALLIOLA E., IOPPOLO, A., PESTALOZZA, S. & RAVIOLI L.

La P.S.A. dei cinghiali. II. POSSIBILITA DEINFEZIONE SPERIMENTALE PER INGESTIONE E PER CONTATTO.

Vet. Ital. 1968, 19, 371-382.

PAN I.C., DEBOER C.J., & HESS, W.R.

A.S.F. Application of immunoelectroosmophoresis for the detection of antibody.

Canad. J. Comp. Med., 1972, 36, 309-316

PAN I.C., TRAUTMAN, R., HESS W.R. DEBOER, C.J. & TESSLER J.

A.S.F. Detection of antibody by reverse singly radial immunodiffusion
Am. J. Vet. Res., 1974, 35, 351-354

PAN I.C., TRAUTMAN, R., HESS W.R., DEBOER C.J., TESSLER J., ORDAS A.,
SANCHEZ BOTIJA C., OVEJERO, J. & SANCHEZ M.C.

A.S.F. Comparison of four serotests on porcine serums in Spain,
Amer. J. Vet Res. 1974, 35, 787-790.

PAN I.C., DEBOER C.J. & HEUSCHELE, W.P.

Hypergammaglobulinemia in swine infected with A.S.F.
Proc. Soc. Expl. Biol. & Med. 1970, 134, 367-371.

PERCY S.E. & FERRIS R.D.

A.S.F.

East African Vet. Res. Organization Annual Report, 1956, 1, 47.

PINI & HURTER

A.S.F. An epizootiological review with special reference to the South
African situation.

J. of South Afr. Vet. 1975, 46, 227-232.

PLACIDI L.

La peste et quelques autres viroses du porc a caracter epizootique.
Bull. Off. Int. Epizoot. 1956, 45, 384-392.

PLOWRIGHT W. & FERRIS R.D.

A.S.F.

East African Vet. Res. Organization, Annual Report, 1957, 1, 20.

PLOWRIGHT, W., BROWN F. & PARKER J.

Evidence for the type of nucleid acid in A.S.F.V.
Arch. Virusforsch (Vien.) 1966 19, 289-304

PLOWRIGHT W. & PARKER J.

The stability of A.S.F.V. with particular reference to heat and PH inactivation.
Arch. Virusforsch (Vien.) 1967, 21, 383-402.

PLOWRIGHT W. PARKER J & STOYLE

The growth of a virulent strain of A.S.F.V. in domestic pigs.
J. of Hygiene 1968, 66 117-134.

PLOWRIGHT W., PARKER J. & PIERCE M.A.

La epizootiología de la P.P.A. en Africa.
Vet. Rec. 1969, 85, 668-674

PLOWRIGHT W., PERRY C.T. & PIERCE M.A.

Infección transovariana del virus de la P.P.A. en el "Ornithodoros Moubata porcinus".
Res. Vet, Sci., 1970, 2, 582-584.

PLOWRIGHT W.

Vector of transmission of A.S.F.V.
Publication CEE (Eur) 1977, 5904 en., 575-590

POLATNICK & HESS W.R.

Altered thymidine kinose activity in culture cells inoculated with A.S.F.V.
Amer. J. Vet. Res. 1970, 31, 1609-1613.

POLO JOVER F. & SANCHEZ BOTIJA C.

La P.P.A. en España
Bull. Off. Int. Epizoot. 1961, 55, 107-157.

POLO JOVER F., & SANCHEZ BOTIJA, C.

Segundo Informe Sobre la P.P.A. en España.

Bull. Off. Int. Epizoot., 1961, 56, 388-398.

POSSENTI A., MICOZZI, G., & CONTI R.

La P.S.A. in provincia di Arezzo, Italia

Zooprofilassi, 1967, 22, 247-255.

PRATTAS, A. & SOUSA DIAS V.

La situation zoosanitaire en Angola

Bull. Off. Int. Epizoot., 1961, 56, 681-700.

RAVIOLI L., PALLIOLA E & IPPOLA, A.

La peste suina africana dei einghiali. I Possibilita d'infezione sperimentale da inoculazione.

Vet. Ital., 1967, 18, 499-507.

ROJAHN A.

Vorkommen und verbreitung der afrikanischen schweinepest im eurpaischen.

Raum. Tierarztl, Umschau. 1965, 20, 368-370 y 373-374.

RUIZ GONZALVO, F., HAAG J., CARNERO R., & LARENAUDIE, B.

P.P.A. Adaptation d'une souche de virus aux cultures de rein de porc.

Rec. Med. Vet. 1966, 142, 1237-1249.

RUIZ GONZALVO F., HAAG J., CARNERO R., & LARENAUDIE, B.

P.P.A. Etude cytigenetique de cellules sensible et de cellules resistantes a une souche de virus adaptee aux cultures cellulaires de rein de porc.

Rec. Med. Vet., 1967, 143, 327-355.

SANTAMARIA J.

La lutte contre la P.P.A.

Rec. Med. Vet., 1964, 140, 1005-1008.

SANCHEZ BOTIJA C.

Diagnóstico diferencial entre la PPC y la PPA.

Comp. Rend. Symposium Internacional de Virología Veterinaria. OIE/AISM Lyon
1962, 43-50.

SANCHEZ BOTIJA, C.

Estudios sobre la P.P.A. en España

Bull. Off. Int. Epizoot., 1962, 58, 707-727.

SANCHEZ BOTIJA, C.

Reservorios del virus de la P.P.A.

Bull. Off. Int. Epizoot., 1963, 60, 895-899.

SANCHEZ BOTIJA, C.

Modificaciones del virus de la P.P.A. en cultivos celulares.

Bull. Off. Int. Epizoot. 1963, 60, 901-916.

SANCHEZ BOTIJA, C.

La Peste Suina Africana.

Zooprofilassi, 1963, 18, 587-607.

SANCHEZ BOTIJA, C., & RADIOLA C.

Presencia del virus de la P.P.A. en el *Haematopinus suis*

Bull. Off. Int. Epizoot., 1966, 66, 699-705.

SANCHEZ BOTIJA C. & POLO JOVER F.

Informe sobre algunos aspectos de la P.P.A. en España

Bull. Off. Int. Epizoot., 1964, 62, 945-952.

SANCHEZ BOTIJA, C. & SANCHEZ BOTIJA, R.

El diagnóstico de la P.P.A. por la prueba de hemoadsorción.

Bull. Off. Int. Epizoot., 1965, 63, 239-250.

SANCHEZ BOTIJA C.

Características actuales de la P.P.A. en España

Comp. Ren Reun. Intern. FAO/OIE sobre las pestes porcinas clásicas y africana, ROMA 1965.

SANCHEZ BOTIJA, C. & SANCHEZ BOTIJA, R.

Resultados de la aplicación del test de Malmquist y Hay al diagnóstico práctico de la P.P.A.

Comp. Ren Reun. Intern. FAO/OIE sobre las pestes porcinas ROMA 1965.

SANCHEZ BOTIJA, C., & ORDAS, A.

Diagnostic différentiel de routine de la PPC et de la PPA par immunofluorescence et hemadsorption associees.

OIE, Paris 1969, 37 Sesion General del Comité.

SANCHEZ BOTIJA, C., ORDAS A., & GARCIA GONZALEZ J.

Investigación de la presencia de anticuerpos en cerdos de focos de P.P.A. con baja mortalidad. Su valor para el diagnóstico.

OIE, Paris, 1969, 37, Sesión Central del Comité.

SANCHEZ BOTIJA, C., ORDAS, A., & GARCIA GONZALEZ, J.

La immunofluorescenza applicata alla ricerca degli anticorpi nella peste suina africana.

Zooprofilassi, 1971, 1, 111-128.

SANCHEZ BOTIJA, C., ORDAS, A. & GARCIA GONZALEZ, J.

La immunofluorescencia indirecta aplicada a la investigación de anticuerpos de la P.P.A.

Rev. Patron. Biol. Animal, 1970, 14, 159-180.

SANCHEZ BOTIJA, C.

El diagnóstico de la P.P.A. por inmunofluorescencia.

Bull. Off. Int. Epizoot., 1970, 73, 1025-1036.

SANCHEZ BOTIJA, C., ORDAS, A., RUIZ GONZALVO, F., & SOLANA A.

Procedures in use for diagnosis of A.S.F.

Publication CCE (Eur.) 1977, 5904 en., 642-652.

SANCHEZ BOTIJA, C. & ORDAS, A.

A.S.F. I Rapid diagnosis by identification of antibodies extracted from tissues using direct immunofluorescence.

II Detection of chronic infection and carrier pigs by immunoelectroosmophoresis.

Publicación CEE. (Eur) 1977, 5904 en., 658-668.

SANCHEZ BOTIJA, R.

Preparación de cultivos de leucocitos de cerdo para el diagnóstico de la P.P.A.

Rev. Patron. Biol. Animal, 1967, 11, 59-72.

SCHOENAERS, F.

P.P.A.

Ann. Med. Vet. 1961, 105, 311-317.

SCOTT, G.R.

The virus of african swine fever and its transmission.

Bull. Off. Int. Epizoot., 1965, 63, 645-677.

SCOTT, G.R.

Prevention, control and eradication of A.S.F.

Bull. Off. Int. Epizoot., 1965, 63, 751-764.

SCOTT, G.R.

A.S.F.

Vet. Rec., 1965, 77, 1421-1427.

SCOTT G.R. & HILL D.H.

Failure to detect, A.S.F.V. in nigerian dwarf pigs,

Bull. Epiz. Dis. Afr. 1966, 14, 55-57.

SHELOVOK, A., VOGEL J.E. & CHI L.

Hemadsorption test for viral agents in tissue culture with special reference to influenza.

Proc. Soc. Exp. Biolg, N.Y. 1958, 97, 802-809.

SHIMIZU M., PAN I.C. & HESS W.R.

T and B lymphocytes in porcine blood.

Am J. Vet. Res., 1976, 37, 309-317.

SIDOROV, M.A.

Leucocyte culture from cells peritoneal fluid and their sensitivity to A.S.F.

Doklady Vsesoyuznoi akademii sel skokhoz. 1971, 12, 29-31.

STABLEFORTH, A.W.

Animal diseases and its impact on farm economy and human health.

Austral Vet., 1962, 38, 538-588.

STEYN D.G.

East african virus diseases in pigs.

Rep. of the Director Vet. Ser Anim. Ind. ONDERTEPOORT. 1932, 1, 99-109.

STONE, S.S. & HEUSCHELE W.P.

Le role de l'hippopotame dans l'epizootiologie de la P.P.A.

Bull Epiz. Afr. 1965, 13, 23-28.

STONE S.S. & HESS W.R.

The effect of some chemical inactivants on the immunogenicity of A.S.F.
Comp. Ren Reunión Intern. FAO/OIE. sobre las pestes porcinas. ROMA 1965.

STONE, S.S. & HESS W.R.

Separation of virus and soluble non-infectious antigens in A.S.F.V. by iso-
electric precipitation.
Virology, 1965, 26, 622-629.

STONE S.S. & HESS W.R.

Antibody response to inactivated preparation of A.S.F.V. in pigs.
Amer. J. Vet. Res., 1967, 28, 475-481.

STONE S.S., DELAY P.D. & SHARMAN E.C.

The antibody response in pigs inoculated with attenuated A.S.F.V.
Canad. J. Comp. Med., 1968, 32, 455-460.

SYDNEY, BRESSE S.S. & DEBOER C.J.

Electron microscope observations of A.S.F.V. in tissue culture cells.
Virology, 1966, 28, 420-428.

SYDNEY, BRESSE S.S.

Electron microscope observation of A.S.F.V. development in vero cells.
J. Gen Virol. 1978. 40, 499-502.

SZENT-IVANYI, T.

Über die afrikanische schweinpest.
M. hefte veterinarmed. 1964, 19, 257-260.

TABARES E., RUIZ GONZALVO F. MARCOTEGUI M.A. & ORDAS A.

Grow purification and fractionation of A.S.F.V.
Publication CEE (Eur) 1977, 5904 en. 507-531.

TERPSTRA J.J.

Afrikaanse varkenspest

Tijdschr. Diergeneesk. 1961, 86, 1324-1331.

THOMAS A.D. & KOLBE F.F.

The wild pigs of South Africa: Their distribution and habits, and their significance as agricultural pests and carrier of disease.

J.S. Afr. Vet. Med. Ass. 1942, 13, 1-11.

TITOLI F, GIALLETTI L., & CASTRO PORTUGAL F.L.

L'immunofluorescenza su colture di leucociti nella diagnosi della peste suina africana.

Atti. Soc. Ital. Sci. Vet., 1969, 22, 858-864.

TORLONE V. & TIFOLI F.

P.P.A.

Atti. XII Congresso Naz. Microbiologia. Perugia 1963, 2, 66.

TUBIASH, H.S.

Quantity production of leucocyte cultures for use in hemadsorption tests with A.S.F.V.

Amer. J. Vet. Res, 1963, 24, 381-384.

VALADAO, F.G.

Etudes sur la P.P.A. au Mozambique.

Bull. Off. Int. Epizoot., 1966, 66, 711-721.

VELHO, A.L.

Observations sur la P.P.A. en Angola

Bull. Off. Int. Epizoot., 1956, 48, 395.

VERTUNOV A.I.

Etudes du metabolisme protique et des constantes sanguines dans la P.P.A. apres une lesion par irradiation.

Trudy vsesoyuz inst. Eksp. Vet., 1952, 29, 200-208.

VIGARIO J.D., RELVAS M.E., FERRAZ, F.P. RIBEIRO J.M. & PEREIRA, C.

Identification and localization of genetic material of A.S.F. by autoradiography.

Virology. 1967, 33, 173-175.

VIGARIO J.D. TERRINHA A.M. & MOURA NUNES J.F.

Antigenic relationships among strains of A.S.F.

Arch Fur Die Ges. Virusforschung. 1974, 45, 272-277.

VIGARIO J.D., CASTRO PORTUGAL F.L., FERREIRA, C.A. & FESTAS M.B.

Purification and study of the structural polypeptides of A.S.F.V.

Publicación CEE (Eur) 1977, 5904 en., 469-482.

VIGARIO, J.D., CASTRO PORTUGAL F.L., FERREIRA, C.A. & FESTAS M.B.

Characterisation of various A.S.F.V. antisera and attempt at serological identification of some viral structural antigens.

Publicación CEE (Eur). 1977. 5904 en. 532-542.

WARDLEY, R.C. WILKINSON, P & H. AMILTOM.

A.S.F.V. Replication in porcine lymphocytes

J. of Virol. 1977, 37, 425-427.

WARDLEY, R.C. & WILKINSON, P.

The growth of virulent A.S.F in pigs monocytes et macrophages.

J. Gen Virol. 1977, 38, 183-186.

WILKINSON P., DONALSON, P.J., GREIG, A.I. & BRUCE W.

Transmission studies with A.S.F. infection of pigs by airborne virus.
J. of Comp Path. 1977, 87, 487-495.

WILKINSON P, DONALSON, P.J., GREIG, A.I. & BRUCE W.

The airborne transmission of A.S.F.V.
Publicación CEE (Eur). 1977 5904 en. 557-574.

WILKINSON, P.

Studies on A.S.F.
Publicación CEE (Eur). 1977, 5904 en., 628-634.

APENDICE BIBLIOGRAFICO

La bibliografía de los dos últimos años no está incluida en el índice por razones de paginación, sin embargo, serán citadas las publicaciones siguientes:

TABARES E., FERNANDEZ, M., SALVADOR-TEMPRANO E., CARNERO, M.E. & SANCHEZ BOTIJA, C.

A reliable enzyme linked immunosorbent assay for african swine fever using the major structural protein as antigenic reagent.

Archives of virology, 1981, 70, 2897-300.

TABARES, E., MARCOTEGUI M.A., FERNANDEZ M., SANCHEZ BOTIJA C.

Proteins specified by african swine fever virus I Analysis of viral structural proteins and antigenic properties.

Archives of Virology. 1980, 66, 107-117.

TABARES E., MARTINEZ J., RUIZ GONZALVO, F., SANCHEZ BOTIJA C.

Proteins specified by african swine fever virus II Analysis of proteins in infected cells and antigenic properties.

Archives of Virology, 1980, 66, 119-132.

SANCHEZ-VIZCAINO J.M., MARTIN-OTERO L., ORDAS A.

Adaptación y evaluación de ELISA para la detección de anticuerpos de la peste porcina africana.

Laboratorio, 1979, 67, 311-319

SANCHEZ-VIZCAINO J.M., SLAUSON D.O., RUIZ GONZALVO, F., VALERO F.

Lymphocyte function and cell mediated immunity in pigs with experimentally induced A.S.F.

Amer. J. Vet. Res. 1981, 42, 1335-1341

SALAS M.L., KUZNAR J., VINUELA E.

Polyadenylation, methylation and capping of the RNA synthesized in vitro by A.S.F. virus.

Virology, 1981, 113, 484-491.

ENJUANES L., CARRASCOSA A.L., VINUELA E.

Isolation and properties of the DNA of A.S.F.

J. Gen Virol. 1976, 32, 479-492.

ORTIN J., ENJUANES L., VINUELA, E.

Cross-links in A.S.F. virus DNA

J. Virol., 1979, 31, 579-583.

A esta lista somera, añadiremos las publicaciones siguientes:

AFRICAN SWINE FEVER, A REASSEMENT by William R. Hess.

Advances in Veterinary Sciences Comparative Medicine

Academic Press.

LE PORC ET SES MALADIES, by P. Mornet & Col.

Maloine S.A. Paris.

Las publicaciones del Simposio Internacional sobre P.P.A.

Reunión de Expertos Mercado Común Europeo/FAO, septiembre 1981 en Sassari Cerdeña de próxima aparición y cuyo índice es:

Contini, A, Cossu P., Firinu A, Rutili D.

La PPA en Cerdeña.

Ordas, A.

La PPA en España

Braco Forte M.
La PPA en Portugal.

Rodríguez E.M.
Experiencias de Laboratorio durante la campaña de erradicación de la PPA en la República Dominicana.

Paula Lyra, T.M. de
La PPA en Brasil.

Simeo R.E.
Epizootiología de la PPA en 1980 y su erradicación en Cuba.

Balbo S.M.
Epizootiología y profilaxis de la PPA en Malta.

Paula Lyra, T.M. de, Matos Pavez, M., Moraes Andrade, C. de
Estudio serológico en PPA realizado sobre la población porcina del Sur de Brasil.

Vigarío J.D. y Col.
Estudios experimentales de portadores en PPA.

Ordas, A., Sanchez-Botija, C., Díaz, S.
Estudios epidemiológicos de la PPA en España.

Wilkinson P.J., Wardley, R.C., Williams, S.M.
Estudios en cerdos infectados con el virus de la PPA (Malta)

Thomson G.R., Gainaru M., Lewis A., Biggs H., Nevill, E. Pypekam H. van der, Olivier J., Gerber L., Esterrhuysen J., Bezuidenhout D., Condy J.
Relaciones entre el virus de la PPA, el cerdo salvaje y el ornithodoros en Africa del Sur.

Sánchez Vizcaino J.M., Ordas A., Salvador E., Crowter J., Carnero R, Castro Portugal, F.
Estandarización de la técnica ELISA para la detección de los anticuerpos del virus de la PPA.

Costes C., Carnero R.
Titulación de anticuerpos por Inmunofluorescencia indirecta en microtécnica.

Lombard M., Rey A., Favre H., Carnero R., Costes C.
Método para la producción de virus PPA en célula Vero cultivada en microportadores.

Hess, W.R.
Estudio del virus de la PPA en cultivos de células de artropodos.

Moura J.F. y Col.
Estudio de la ultra-estructura del virus de la PPA, su multiplicación in vivo en el ganglio linfático.

Gayot G., Costes C., Carnero R.
PPA, estudio de los radicales iodados sobre el virus.

Wardley R.C., Wilkinson P.J.
The effect of ASF virus on mitogen-driven assays.

Norley S., Wardley, R.C.
Complement-mediated lysis of ASF virus infected cells.

Mebus C., McVicar J.W., Dardiri, A.H.
Comparison of the pathology of high and low virulence ASF virus infections.

Sánchez-Vizcaino, J.M., Mebus C.A., McVicar J.W., Valero F.
Cell-mediated immunity studies on normal and gnotobiotic pigs after inoculation with different field strains of ASF virus.

Ruíz-Gonzalvo F., Carnero M.E., Bruyel, V.
Respuesta inmunológica del cerdo a la partícula viral ASF parcialmente atenuada y su resistencia a las partículas virulentas homólogas y heterólogas.

Bommeli E., Kihm U., Ehrensperger F.
Preliminary study on immunisation of pigs against ASF.

Castro Portugal F.L. y Col.
Estudio inmunológico de algunos polipéptidos del virus ASF.

Tabares E., Fernández M., Salvador E., Carnero M.E.
Proteínas inducidas por el virus de la PPA, estudio inmunológico de la proteína VP. 73.

Salas M.L., Kuznar J., Viñuela, E.
Síntesis ARN por el virus de la PPA.

Wesley R.D., Pan I.C.
Differentiation of Vero cell-adapted ASF virus isolated by restriction endonuclease analysis.

Talavera A., Almendral J.M., Ley V., Viñuela E.
Cloning and mapping of restriction fragments from ASF virus DNA.

Becker, Y.
Recombinant DNA technology and its possible application to ASF research.

Las publicaciones referentes a la Sesión Plenaria del Office International des Epizooties que se celebró en mayo de 1982, son de gran interés por tener un día dedicado a PPA.

Las publicaciones podrán solicitarse a:

O.I.E.
12 rue de Prony
Paris 17, FRANCIA.



EDITORIAL IICA

IICA

