

XX REUNION NACIONAL AMVEC 85

TITULO AISLAMIENTO Y ESTUDIO DE UN VIRUS PORCINO PARECIDO A LOS PARA
 AUTOR (es) MIXOVIRUS^a. Martínez L., A.; *1/, Correa G., P.^{1/}; Faiardo M., R.^{1/}
 INSTITUCION Garibay, M.^{2/}; Moreno-López, J.^{3/}. *INIP, SARH,^{1/}; Práctica -
 AREA Privada ^{2/}; U. Agr. de Suecia ^{3/}. Sanidad.

En Octubre de 1984, en una granja porcina de La Piedad, Michoacán, se presentó un síndrome con encefalitis y 15-20% de mortalidad en cerdos de engorda. Para intentar determinar el ó los agentes causales del síndrome, se nos remitió un encéfalo y la mitad de otro, refrigerados y en glicerina, procedentes de cerdos que murieron presentando el síndrome mencionado.

OBJETIVO.- Dado que se sospechaba de algún agente viral, la finalidad de este trabajo fue intentar aislar y estudiar el agente involucrado.

MATERIALES Y METODOS.- CULTIVOS CELULARES.- Con una parte del tejido encefálico y 9 partes de medio F-15, sin suero (SS), se preparó un macerado, que fue centrifugado 15' a 1600 rpm, en refrigeración. Con 2.5 ml del sobrenadante obtenido se inoculó 1 botella de dilución de leche que contenía un monoestrato de células turbínadas de bovino (TB); previamente se le retiró el medio de crecimiento y una vez agregado el inóculo, se incubó durante 1 hora a 37°C, moviendo la botella cada 10'. Después de este período de adsorción, se le retiró el inóculo al monoestrato, se le agregó medio F-15 (Gibco) de mantenimiento (más 2% de suero fetal comercial de ternero) y la botella se volvió a incubar a 37°C. Simultáneamente se utilizó una botella de dilución de leche que contenía un monoestrato con células hermanas de la botella anterior, al cual se le cambió el medio de crecimiento por el de mantenimiento. Ambas botellas fueron observadas durante 6 días.

2º PASE.- A la botella del primer pase se le retiró el 50% del monoestrato, junto con el medio y se le agregó medio de crecimiento fresco, más células TB procedentes de otra botella; se mantuvo en observación durante 2 días; y después se le congeló a -70°C.

3er. PASE.- El inóculo del segundo pase se descongeló una vez, se centrifugó 2 veces en refrigeración a 2400 rpm durante 15'; en cada ocasión el sobrenadante se filtró 2 veces por una membrana Millipore de 0.22 micras. Con 3 ml de este espécimen se inoculó una botella (de dilución de leche) que contenía células TB. En cada pase siempre se usó como control una botella con células hermanas sin inocular. Los dos se observaron durante 2 días y después la botella inoculada se sacrificó, igual que siempre, mediante congelación a -70°C.

4º PASE.- Para realizar el 4º pase, al inóculo del 3er. pase se le dió el mismo tratamiento que al inóculo del 2º pase.

5º PASE.- El inóculo del 4º pase se descongeló y centrifugó a 2400 rpm 20', en refrigeración; con una alícuota de 3 ml, diluida 1:10, se infectó una botella que contenía células TB; se observó durante 2 días y se sacrificó a -70°C.

6º PASE.- Con el inóculo del 5º pase se infectó una botella de dil. de leche. Se observó durante 2 días. Simultáneamente se infectaron tubos de Leighton con células TB, a las laminillas se les fijó en metanol, a las 48 hs postinoculación, para teñirlas con Hematoxilina y Eosina. También se infectaron 3 Botellas de Blake conteniendo células TB; que fueron sacrificadas a los 2 días post inoculación, para hacer estudios de microscopía electrónica.

7º PASE.- Se tomó una parte del sobrenadante, antes de congelar el monoestrato del 6º pase y se diluyó 1:10; con 3 ml de esta dilución se infectó un monoestrato de células TB. Se mantuvieron en incubación durante 30 hs.

8º PASE.- Se descongeló una alícuota del 7º pase y con ella se hizo el 8º pase; éste se mantuvo en observación durante 3 días, aunque a las 48 hs. ya había ECP.

INOCULACIÓN DE CELULAS PK-15 Y MDBK.- Con el 5º pase del virus reproducido en células

TB, se inocularon monoestratos de células MDBK y PK-15 de 2 días de edad y con 90% de confluencia.

HISTOPATOLOGIA DE CELULAS Y MUESTRAS DE CEREBRO. - Las laminillas con células TB - inoculadas pertenecientes al 6^o pase, fueron fijadas en metanol a las 48 hs postinoculación y luego teñidas con Hematoxilina y Eosina. Simultáneamente se fijaron y teñieron laminillas con células TB controles no inoculadas. También una muestra de encéfalo fue fijada en formal al 10%, para hacerle estudios de histopatología.

TINCION DE CONJUGADO DE COLERA PORCINO (CP). - Se prepararon 4 tubos de Leighton - con células TB; dos fueron inoculadas con el espécimen del 5^o pase y 2 tubos no fueron inoculados y 1 tubo de Leighton con células PK-15 (control positivo) fue inoculado con la cepa "A" de CP. Todas estas laminillas fueron fijadas a las 48 hs postinoculación y después teñidas con conjugado de CP (González et al, 1977).

INOCULACION DE CONEJOS. - Con el espécimen original diluido 1:10 se inocularon 2 conejos; el primero se inoculó con 1 ml por vía intramuscular, 1 ml por vía subcutánea (SC), 1 ml por vía oral y 0.5 ml por vía conjuntival; al otro conejo se le inoculó por las mismas vías con el doble de inóculo (excepto la vía conjuntival que recibió la misma dosis). Se dejaron 2 conejos como controles sin inocular.

Con el 5^o pase del virus, cultivado en células TB, se inocularon 1 conejo con 1.5 ml por vía oral, y otro con 1.5 ml por vía intramuscular (IM). Se dejó 1 conejo como control sin inocular. Otros conejos fueron inoculados con otro espécimen (encéfalo) proveniente de conejos que murieron al ser inoculados con tejidos procedentes de cerdos afectados por el mismo síndrome. El macerado se diluyó 1:10 y se centrifugó 2 veces a 2000 rpm, 15' en cada vez. Un conejo se inoculó con 1.5 ml por vía I/M en una pierna y 1.5 ml por vía S/C en la otra pierna. Otro conejo fue inoculado por vía oral con 3 ml.

INOCULACION DE CERDOS HIPERINMUNIZADOS A CP. - Con el 6^o pase del virus, se inocularon 2 cerdos hiperinmunizados a CP, de aproximadamente 3 meses de edad; un cerdo fue inoculado con 3 ml por vía I/M en la pierna; otro cerdo fue inoculado con 3 ml por vía oral, 1 ml por vía nasal (lado derecho) y 1 ml por vía conjuntival (lado derecho); y un tercer cerdo sin inocular, fue mantenido en contacto con los dos anteriores. Estos cerdos fueron observados durante 19 días; diariamente se les tomó la temperatura y fueron sangrados cada 3er. día para hacer biometrías hemáticas.

INOCULACION DE UN CERDO NORMAL. - El espécimen original fue diluido 1:5 en medio de Eagle sin suero y centrifugado en refrigeración a 3200 rpm, durante 30'; se le congeló a -70°C, y se le descongeló para ser inoculado en un cerdo aparentemente normal, por vía I.M., i.V., S.C., conjuntival, oral y nasal. Diariamente se le registró la temperatura rectal y se le observó clínicamente durante 20 días.

MICROSCOPIA ELECTRONICA. - Un volumen de 300 ml perteneciente al 6^o pase, fue dializado, en un dializador Millipore (Catálogo XX42-14252), obteniéndose un concentrado final de 60 ml; esta muestra después fue centrifugada a 35,000 rpm, 50', a una temperatura de 7°C. El sedimento obtenido fue teñido con la técnica de tinción negativa con ácido fosfotúngstico, para después observarlo al microscopio electrónico.

PRUEBAS DE HEMOAGLUTINACION. - Se hicieron pruebas de hemoaglutinación en tubo, con el virus del 7^o y 8^o pases, ante eritrocitos de cuy y borrego, y se determinó el título hemoaglutinante. También se hicieron pruebas de hemoaglutinación en placa con eritrocitos de conejo.

PRUEBA DE SERONEUTRALIZACION ANTE UN ANTISUERO CONTRA AUJESZKY. - Con el virus obtenido del 5^o pase se hizo una prueba de seroneutralización, por el sistema de microtitulación, con un antisuero contra Aujeszky. Para la prueba se utilizó virus constante y diluciones de suero. Se hizo la lectura a los 7 días postinoculación. Con el suero se hicieron diluciones triples y el virus se utilizó a la dilución de 10⁻⁴. Simultáneamente se tituló el virus para corroborar su título.

RESULTADOS:

CULTIVOS DE CELULAS TB. - Desde el primer pase se observó ECP que consistió en: destrucción del monoestrato, células alargadas, estrelladas, hoyos en el monoestrato, células redondeadas y otras arrugadas, gran cantidad de células muertas, células redondas agrupadas, unas veces despegadas y otras pegadas al vidrio. En general a las 48 hs postinfección ya se observaba destrucción del monoestrato en un 60-70%.

CELULAS MDBK. - El monoestrato de células MDBK mostró ECP, a los 2 días postinoculación que consistió en: células arrugadas y estrelladas pegadas al vidrio; a los 3 días se observaron espacios sin células en el monoestrato, muchas células muertas flotando, células redondas y agrandadas - pegadas al vidrio y algunas células alargadas y estrelladas; al 4º día postinoculación el monoestrato ya estaba destruido en un 80%, en algunas partes el monoestrato tenía aspecto de red.

CELULAS PK-15. - Las células PK-15 mostraron ECP, a los 5 días postinoculación, que consistió en: demasiadas células muertas, células agrandadas y el monoestrato ya no proliferó.

HISTOPATOLOGIA DE CELULAS Y MUESTRAS DE ENCEFALO. - Las células inoculadas mostraban destrucción del monoestrato, muchas células agrupadas (sincitios), muchas células con núcleos picnóticos y pequeños; muerte celular en diferentes grados: células con núcleos pequeños - picnóticos y citoplasma acidófilico, núcleos fraccionados y células con desaparición del núcleo (cariorexis y cariólisis). También se observaron vacuolas en algunas células.

En el encéfalo se encontraron zonas de infiltración perivascular que correspondían a células mononucleares (infiltración linfocitaria perivascular).

TINCION CON CONJUGADO DE COLERA PORCINO. - Las células TB inoculadas con el espécimen del 5º pase y las no inoculadas, al ser teñidas con conjugado de CP, ambas fueron negativas. Las células PK-15 (controles positivas) dieron fluorescencia positiva.

INOCULACION DE CONEJOS. - Los conejos inoculados con el macerado del encéfalo original, murieron antes de 24 hs postinoculación. Al examen histopatológico de los órganos de estos animales no se observaron alteraciones relacionadas con la inoculación. También los conejos inoculados con el macerado procedente de encéfalos de conejos que murieron al ser inoculados con molliendas de órganos provenientes de cerdos afectados, murieron a las 24 hs postinoculación. Los 2 conejos inoculados con el virus que había sido pasado 5 veces en células TB, no mostraron alteraciones en su temperatura ni en su comportamiento, en un período de 1 semana en que fueron observados.

INOCULACION DE CERDOS HIPERINMUNES A CP. - Se observó que el cerdo inoculado parentalmente mostró signos respiratorios severos (estertores marcados y respiración abdominal) a los 3 días postinoculación y así siguió hasta el 10º día postinfección. Al 6º día se empezó a notar conjuntivitis con mucosas oculares congestionadas y lagrimeo con lagañas, esto duró hasta el 8º día, acompañado de ligera cianosis en la región ventral, ligeros signos de incoordinación, hijares un poco hundidos y lomo arqueado. El cerdo inoculado por vía oral, nasal y conjuntival mostró conjuntivitis a partir del 7º día postinoculación. Esto duró hasta el día 16º, acompañado por lomo arqueado, diarrea y ligera respiración abdominal. Ambos cerdos mostraron respectivamente temperaturas máximas de 40.4 y 40.1 °C el 16º día postinoculación. El cerdo puesto en contacto, en el día 7 mostró ligera congestión en mucosas oculares, dorso arqueado, ojo derecho con ligera opacidad, ojos un poco llorosos. Al 8º día, al hacerle ruido, el cerdo mostraba ligeros temores. Las biometrías sanguíneas de los 2 cerdos no mostraron cambios importantes.

INOCULACION DE UN CERDO NORMAL. - A partir del 4º día postinoculación se observó ligero aumento de temperatura (con máxima de 40 °C); anorexia poco marcada a partir del 6º día; cola caída, conjuntivitis pronunciada, inflamación en el área periorbital, exudado nasal; y a partir del día 9 se presentó ceguera parcial unilateral con ligera opacidad de córnea, cabeza torcida, incoordinación, posición de "perro sentado", temores, caminaba en círculos, "pedaleo", debilidad, dificultad para levantarse, flancos poco hundidos y disminución de la grasa subcutánea.

MICROSCOPIA ELECTRONICA. - La técnica de tinción negativa con ácido fosfotúngstico, reveló estructuras con morfología parecida a la de los paramixovirus, con tamaño de aproximadamente 165 nanómetros; con proyecciones cortas en la periferia, de distribución homogénea.

PRUEBAS DE HEMOAGLUTINACION. - Se obtuvieron títulos hemoaglutinantes de 1:40, al utilizar glóbulos rojos de cuye y de borrego. Con glóbulos rojos de conejo se produjo ligera aglutinación, detectable sólo al observar al microscopio con bajo aumento.

SUERONEUTRALIZACION. - La prueba de sueroneutralización nos reveló que el virus no fue neutralizado por el suero hiperinmune a pseudorrabia; el virus tenía un título de 40.7 unidades formadoras de efecto citopático.

DISCUSION. - Las lesiones de encefalitis observadas en el tejido encefálico porcino original nos sugieren una infección viral. El resultado negativo de las células inoculadas al ser teñidas con -- conjugado específico de CP, descarta la posibilidad de CP. La muerte súbita de los conejos inoculados con macerados cerebrales, nos revela que los signos clásicos y lesiones de PRV en conejos no se manifestaron, por lo tanto se puede descartar PRV. Las manifestaciones clínicas de los cerdos -- inoculados, no correspondieron a las presentaciones clásicas de CP ni de Pseudorrabia. La microscopía electrónica nos reveló partículas con morfología similar a un Paramixovirus, con tamaño de 165 nm. La prueba de seroneutralización indicó que no se trataba de un virus de Aujeszky. Se podría considerar que hay ciertas semejanzas entre este virus aislado y el comunicado anteriormente como productor del "síndrome del ojo azul" (Stephano, H.A., et al, 1981; Stephano et al, 1982). Sin embargo, se requiere de la realización de pruebas serológicas específicas, que permitan relacionar estos dos agentes etiológicos. Este síndrome también fue comunicado por Campos (1981), atribuyéndolo a problemas nutricionales.

CONCLUSIONES. - 1.- Se aisló un virus a partir de cerebro de cerdos con signos y lesiones de encefalitis. 2.- El virus aislado produce un claro de ECP a partir de las 30-48 hs postinoculación, en células TB; en células PK-15 y en MDBK tardó de 5 a 7 días. 3.- El virus tiene morfología parecida a la de un Paramixovirus y mide 165 nm. 4.- Hemoaglutina los glóbulos rojos de borrego, cuye, y en menor grado los de conejo. 5.- La reproducción de la enfermedad en los cerdos inoculados sugiere que es el agente causal de la enfermedad observada en la granja afectada. 6.- El virus mata en 24 hs, a los conejos inoculados por vía parenteral, oral y ocular, cuando proviene de macerados de cerdos muertos por el síndrome; pero no los mata al ser inoculados con el 5º pase del virus reproducido en células TB. 7.- Las pruebas realizadas sugieren que no se trata de Cólera Porcino ni de Pseudorrabia. 8.- El virus aislado tiene ciertas similitudes con el agente reportado como productor del "síndrome del ojo azul"; sin embargo, aún no se han hecho pruebas serológicas específicas que permitan relacionarlos.

LITERATURA CITADA. -

Díaz González, A., M. del C. Ochoa, N. Mancisidor, M. Snyder y P. Correa. Producción y evaluación de un conjugado para detectar virus de cólera porcino. I Congreso Latinoamericano de Veterinarios Especialistas en Cerdos. XIII Convención AMVEC. Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Xochimilco, 6-10 de Sept. México, D.F., 1977.

Stephano H., A., Ramírez T., C.A., Gay G., M. y Maqueda A., J.J., Congreso Anual --- AMVEC, Ixtapa, Zih., Gro., 1981.

Campos M., E., "Síndrome del ojo azul o cerdos zarcos". XII Convención Amvec - Ixtapa 1981, Hotel Holiday Inn., Ixtapa, Zih., Gro., 1981.

Stephano H., A., Ramírez T., C.A., Gay G., M. y Maqueda A., J.J., International Pig Veterinary Society Congress. México, D.F., 1982.

Agradecimiento. - Se agradece la colaboración técnica de: Sr. J. Castrejón G., I. Ramos R., E. Delgadillo y M. Arellano; y a la Dra. C. Soler, y Sr. P. Romero (IIBM, UNAM).