

VIABILIDAD DEL PARAMIXOVIRUS PORCINO DE LA PIEDAD MICHUACAN (PP-LPM) A DIFERENTES TEMPERATURAS

Cruz G., H.; Martínez L., A.; Correa G., P.; Colinas T., A.
 INIFAP-SARH. Km 15½, carretera México-Toluca, Delegación Cuajimalpa 05110 México, D.F., A.P. 41-652.

INTRODUCCION

A principios de 1980 se observó en granjas de La Piedad, Michoacán, México, una enfermedad caracterizada por producir en cerdos, de diferentes edades, opacidad de la córnea en uno o en ambos ojos. Este padecimiento fue denominado "síndrome del ojo azul o cerdos zarcos", y se le atribuyó inicialmente a una deficiencia de riboflavina (1 y 2). A mediados de ese mismo año se presentó un brote de encefalitis con opacidad de la córnea en lechones lactantes, de donde se aisló un virus con propiedades hemaglutinantes (12). Posteriormente este agente denominado virus del síndrome del ojo azul fue ubicado como un nuevo miembro de la Familia Paramixoviridae (13). En 1984, se aisló otro virus parecido a los Paramyxovirus, que también mostró propiedades hemaglutinantes (5), y que tiene ciertas semejanzas con el virus reportado como productor del síndrome del ojo azul (6). En 1986 este último virus fue caracterizado como un Paramyxovirus y se le denominó Paramyxovirus porcino de La Piedad, Michoacán (pp-LPM) (3 y 8).

Se ha informado que el virus del ojo azul se inactiva a 56°C después de 4 h, mientras que la hemaglutinación (HA) viral se pierde hasta las 48 a 60 h a 56°C (11). Con el objeto de conocer la estabilidad de las propiedades HA y la infectividad en cultivos celulares (CC) PK-15, medida con base en el efecto citopático (ECP), se realizó este estudio, en el cual se sometió a diferentes temperaturas y por diferentes períodos, el pp-LPM.

MATERIAL Y METODOS

Antígeno viral.— Se utilizaron 2 lotes del Pp-LPM: el lote A del 10° pase en CC (los primeros 7 pases en células de cornete bovino (CB) y los 3 últimos en células de riñón de cerdo (PK-15)); con título HA de 1:64/0.05 ml y título por ECP de 10^{7.5} dosis formadoras de efecto citopático (DFEC) 50/0.025 ml, calculado por el método de Karber (10) (las titulaciones por HA se hicieron en 0.05 ml y las del ECP/0.025 ml); el lote B fue preparado con el 12° pase, también en cultivos celulares (los primeros 7 en CB y los últimos 5 en PK-15), con título HA de 1:32, y por ECP de 10^{2.5} DFEC.

Tratamiento a diferentes temperaturas.

Antes de someter el virus a las diferentes temperaturas, los lotes se descongelaron de -70°C a temperatura ambiente ($\pm 21^\circ\text{C}$), se homogeneizó, se dividió en alícuotas de 1 ml cada una, e inmediatamente se congelaron simultáneamente a -70°C. Después se descongelaron a temperatura ambiente para someterlas después a las diferentes temperaturas.

Veintiocho alícuotas del lote A fueron sometidas a 37°C dentro de una estufa para CC. Cada 5 días, durante un período de 45, se extrajeron 2 alícuotas, después se sacaron dos alícuotas a los 59, 72, 86 y 110 días. Antes de someterlas a 37°C, se separaron dos alícuotas, las cuales fueron tituladas, una inmediatamente por HA y la otra se congeló de nuevo a -70°C para después ser titulada por ECP.

Doce alícuotas del lote B fueron sometidas a 56°C, en un recipiente de baño María. Se extrajo, del baño María, 1 par de alícuotas cada 5 minutos, durante un período de 30 minutos. Antes de calentarlas se separaron dos alícuotas recién descongeladas; una fue titulada inmediatamente por HA y la otra fue congelada y posteriormente titulada por ECP.

Veintiocho alícuotas del lote B fueron sometidas a 87°C en un recipiente de baño María. Se extrajeron del baño María 2 alícuotas a intervalos de un minuto, durante un período de 14 minutos. Todas las alícuotas del Pp-LPM, una vez que fueron sometidas a las diferentes temperaturas por los diferentes períodos de tiempo, se pusieron en refrigeración, por aproximadamente 5 minutos, e inmediatamente se congelaron a -70°C; y se descongelaron nuevamente al titularlas por HA y ECP.

Titulación Viral.

Todas las muestras fueron tituladas por HA, por el sistema de microtitulación, en microplacas de plástico de 96 pocitos con fondo en forma de "U", utilizándose glóbulos rojos (GR) de gallo, diluidos al 0.5% en solución salina (SS) con pH de 6.2; y la lectura se hizo aproximadamente a los 30 minutos. Fueron usadas 4 columnas de pocitos para titular cada muestra, el esquema de dilución es de 1:2 hasta 1:128. Para determinar el título por ECP, las muestras fueron tituladas según el método descrito por Snyder, -- Stewart and Kreese (10); y se emplearon células PK-15 y MEM* con 10% de suero fetal de bovino. Las placas fueron leídas a los 7 días de haber estado en incubación, a 37°C, en una estufa de CO₂. El ECP en algunas ocasiones fue difícil de distinguir en el microscopio de luz invertido, por lo que se montó una modificación que complementara esta prueba, y que permitiera decidir si era positiva o negativa, la lectura dudosa que se estaba realizando en el microscopio. Esta prueba consistió, en realizar hemoaglutinaciones con el líquido de los pocitos sospechosos, comparado con el de los positivos y negativos. El procedimiento fue como sigue: si la lectura fue dudosa se consideró que cada pozo podría o no tener virus, replicado en las células. Para detectar al virus, se preparó otra placa para hacer HA, a la que se le agregó a cada pozo 50 microlitros de SS y con un microdilutor de 50 microlitros se tomó la muestra problema a partir del pozo correspondiente al cultivo "infectado" y luego se depositó el microdilutor en el pozo donde se haría la HA. Una vez que se mezcló bien con la SS (quedando diluido 1:2) se retiró el microdilutor. Después de agregar el espécimen problema, se depositaron en todos los pozos 50 microlitros de GR de gallo al 0.5%; se agitó bien la placa y se incubó a temperatura ambiente (\pm 22°C) y la lectura se realizó aproximadamente a los 30 minutos. Este procedimiento se hizo con todos los pozos que daban lectura dudosa, y como controles se utilizaron algunos pozos negativos y positivos; los que al término de la prueba tendrían que resultar negativos y positivos respectivamente. Cuando estos controles fueron negativos y positivos, respectivamente, la prueba fue válida (Martínez et al, datos no publicados) (7).

RESULTADOS.

A 37°C el virus ha conservado su propiedad HA hasta los 110 días; y no se realizaron muestreos posteriores; el título HA de 1:128 se conservó hasta los 30 días; del 35 al 110 días fluctuó entre 1:16 y 1:64. La capacidad infectante para células al ser medida por ECP se conservó a títulos virales de 10^{0.30}, hasta el día 110 del tratamiento. A 56°C conservó un título HA de 1:32 hasta el minuto 25; y al minuto 30 el título HA descendió a 1:16. La capacidad infectante medida por ECP descende paulatinamente de 10^{2.5} a 10^{1.125} a los 5 minutos, a 10^{0.875} a los 10 y hasta 10^{0.5} a los 15 minutos. Al ser mantenido a 87°C durante 1 minuto, la HA descendió de 1:32 a 1:4 y a partir de los 2 minutos la perdió completamente. Al titular por ECP, se encontró que el título de 10^{2.5} bajó a 10^{0.5} al minuto y se conservó así a los 2 minutos; y a los 3 minutos bajó a 10^{0.37}. Se titularon también muestras colectadas a los 6 y 8 minutos y se observó ECP sospechoso, probablemente debido a toxicidad para las células, pues al corroborar éste por HA, las --

* Cat. GIBCO 410-1500 EB

muestras fueron completamente negativas.

CONCLUSIONES

Los resultados hasta aquí encontrados, demuestran que el Pp-LPM conserva sus propiedades HA e infectivas en CC, por un período igual o mayor a 110 días de tratamiento a 37°C. A 56°C conserva sus propiedades HA por lo menos hasta los 30 minutos; y sus propiedades infectivas en CC hasta los 15 o más minutos. A los 87°C conserva sus propiedades HA durante 1 minuto y sus propiedades infectantes por lo menos durante 3 minutos

REFERENCIAS

- 1.- Campos M., E., 1981. "Síndrome del ojo azul o cerdos zarcos". Mem XVII - Convención AMVEC-IXTAPA, 81.
- 2.- Campos M., E., y Calderón S., E., 1982. "The blue eye syndrome", Síndrome del ojo azul. Proc of the international Pig Veterinary Society Congress México, P 171.
- 3.- Correa-Girón, P.; Martínez L., A.; Ericsson, A.; and Moreno-López J. 1986. Characterization of a Paramyxovirus isolated from the brain of a piglet in México. Proc. of the International Pig Veterinary Society 9th Congress, Barcelona, Spain. Chap. 4, p 205.
- 4.- Hanson R., P., 1978. Newcastle disease in: Diseases of poultry 7th ed., Iowa State University Press, Ames, Iowa, U.S.A. p 513-535.
- 5.- Martínez L., A.; Correa G., P.; Fajardo M.R.; y Garibay S., M., 1984. Aislamiento y estudio de un virus porcino parecido a los Paramyxovirus. Encuentro sobre enfermedades infecciosas del cerdo. AMVEC, ed. por P. Correa y A. Morilla, p 15.
- 6.- Martínez L., A.; Correa G., P.; Fajardo M., R.; Ramos R., I.; Garibay S., M.; y Moreno-López J., 1985. Un virus parecido a los Paramyxovirus productor de signos respiratorios, nerviosos y mortalidad en cerdos. Mem. XVI Cong. Nal. de Microbiología, Dgo. Méx. p 83.
- 7.- Martínez L., A., y colaboradores., 1988. Datos aún no publicados.
- 8.- Moreno-López, J.; Correa G., P.; Martínez L., A.; and Ericsson, A., 1986. Characterization of a Paramyxovirus isolated from the brain of a pig - let in México. Arch of virol 91:221.
- 9.- National Academy of Sciences National Research Council Publication 1038, 1963. Methods for the examination of poultry biologics. Chap three pp 38-40. National Academy of Sciences-National Research Council, - - Washington, D.C.
- 10.- Snyder M., L.; Stewart W., C.; Kreese J., I.; 1981. Microtitration Test for Pseudorabies and Transmissible Gastroenteritis Viruses in: Serologic Microtitration Technique. USDA, NVSL, Ames, Iowa. pp 44-48.
- 11.- Stephano, A. y Gay, M., 1985. Síndrome del ojo azul en cerdos. Mem. Encuentro sobre enfermedades del cerdo, AMVEC, ed. por P. Correa y A. Morilla, p 1-13.
- 12.- Stephano H., A.; Gay G., M.; Ramírez T.C.; Maqueda., J.J., 1981. Estudio de un brote de encefalitis en lechones por un virus hemaglutinante. Mem de la XVII Convención AMVEC-IXTAPA 81.
- 13.- Stephano H., A.; Gay G., M.; and Kreese, J., 1986. Properties of a Paramyxovirus associated to a new syndrome (blue eye syndrome) characterized by encephalitis, reproductive failure and corneal opacity. Proc of the International Pig Veterinary Society 9th Congress, Barcelona, Spain, p 455.
- 14.- Matthews, R.E.F., 1982. Classification and nomenclature of viruses. Fourth report of the International Committee on Taxonomy of viruses. - Karger. Medical and Scientific Publishers. Basel. München. Paris. London. New York. Tokyo, Sydney. p 104-105.