

AISLAMIENTO DE PARVOVIRUS PORCINO DE FETOS MOMIFICADOS^a

ALFONSO FALCON N.^{b,e}
MARTHA E. RODRIGUEZ V.^c
DIODORO BATALLA C.^d
JOSE CAMACHO M.^c
ELISEO HERNANDEZ B.^{d,e}
ABEL CIPRIAN C.^{c,e}

RESUMEN

Se trabajaron 26 fetos momificados de alrededor de 70 días de edad. Sólo uno presentó títulos superiores a 1:4096 con la prueba de hemoaglutinación (HA). La prueba de inmunomicroscopía electrónica reveló partículas virales de simetría icosaédrica de 25 nm de diámetro. Se aisló el PPV en cultivos primarios de riñón fetal de cerdos demostrado por el efecto citopático y por pruebas de IHA en los sobrenadantes de los cultivos celulares.

- a. Recibido para su publicación; 11 de diciembre de 1987.
- b. Centro Experimental Pecuario de "Aldama", Sector Pecuario INIFAP-SARH. Apdo. Postal 14, V. Aldama, Tamps.
- c. Coordinación General de Investigación y Estudios de Postgrado, FES-Cuautitlán, UNAM. Apdo. Postal 222, Cuautitlán Izcallí, Edo. de México.
- d. Proyecto de Rabia-Centro Nacional de Investigaciones en Microbiología Sector Pecuario, INIFAP-SARH, km. 15.5 Carr. México-Toluca, D.F., 05110.
- e. Proyecto de Aujeszky Centro Nacional de Investigación en Microbiología, Sector Pecuario, INIFAP-SARH, km. 15.5 Carr. México-Toluca, D.F.

Téc. Pec. Méx. Vol. 26, No. 2 (1988)

INTRODUCCION

El parvovirus porcino (PPV) es un agente con amplia distribución en el mundo, que produce fallas en la reproducción de la cerda y se caracteriza por muerte embrionaria y fetal sin signos clínicos de la madre^{7,8} y recién se ha confirmado que PPV es causa común de muerte fetal con momificación^{1,4}.

El parvovirus porcino pertenece a la familia PARVOVIRIDAE, tiene una cadena sencilla de ácido desoxirribonucleico (ADN) y es un virus desnudo de simetría icosaédrica que mide de 18 a 26 nm de diámetro, es probable que con 32 capsómeros; sus polipéptidos estructurales son por inmunología indistinguibles⁹. Las propiedades hemoaglutinantes del virus son utilizadas para realizar la prueba de hemoaglu-

nación (HA) a partir de muestras de búmerina sérica bovina al 0.1% "SSF-AB"^{1,5}.

En México, se ha detectado la presencia del PPV en el 3.9% de los fetos momificados colectados en rastros del Estado de México por medio de la prueba de HA y microscopía electrónica (ME)^{2,3}, sin embargo, no se informa el aislamiento del virus, por lo que el objetivo de este trabajo fue aislar e identificar por primera vez el PPV a partir de fetos momificados en México.

MATERIAL Y METODOS

Se trabajaron 26 fetos momificados que fueron colectados (23) de granjas y (3) del rastro de Ferrería, D.F. Los fetos se lavaron y se midieron para determinar la edad de la muerte (Fig. 1). Se tomaron el hígado y los pulmones y se homogeneizaron por separado con utilización de un triturador de tejidos TEN BROECK y una solución salina fosfatada (pH 7.2) completa de Dulbecco "SSF-D" en una proporción de 1:10. Las células se destruyeron por medio de tres ciclos de congelación (-70°C) y descongelación (37°C); la suspensión se separó por centrifugación a 3000 X G y el sobrenadante se almacenó a -70°C. Con estos sobrenadantes se realizaron las pruebas de Hemoaglutinación (HA) de acuerdo a Joo, Donaldson-Wood y Johnson⁵. Se utilizó una suspensión de glóbulos rojos de cobayo al 5% en una solución salina fosfatada con al-

El parvovirus porcino (PPV) y el antisuero homólogo de referencia fueron proporcionados por el Dr. Hans Joo, de la Universidad de Minnesota, E U.A. Se utilizaron microplacas con fondo en "U" de 96 pozos, en cada pozo se colocaron 0.02 ml de SSF-AB y en el primero se agregó 0.025 ml de los sobrenadantes de hígado o de pulmones y se realizaron diluciones dobles de 1:2 hasta 1:65, 536, luego se efectuó una leve agitación de las placas y se incubaron a 4°C durante 12 h. La prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IHA) se realizó de acuerdo a Joo, Donaldson-Wood y Johnson^{5,6}.

Por otro lado, los sobrenadantes fueron tratados con éter y cloroformo (volumen a volumen) y de acuerdo a la técnica descrita por Vannier, Leunen y Tillon^{1,6}, las muestras se incubaron a 4°C durante siete h con períodos de agitación de una hora y a continuación se les realizó la prueba de HA.

Para la realización de la prueba de inmunoelectromicroscopía (IME) se utilizó una gota del antisuero de PPV y una gota de la muestra sospechosa, se incubó a 4°C durante 12 h, después se tñieron con ácido fosfotúngstico al 1% y se observó en el microscopio electrónico de transmisión marca Jeol, modelo JEM-100S.

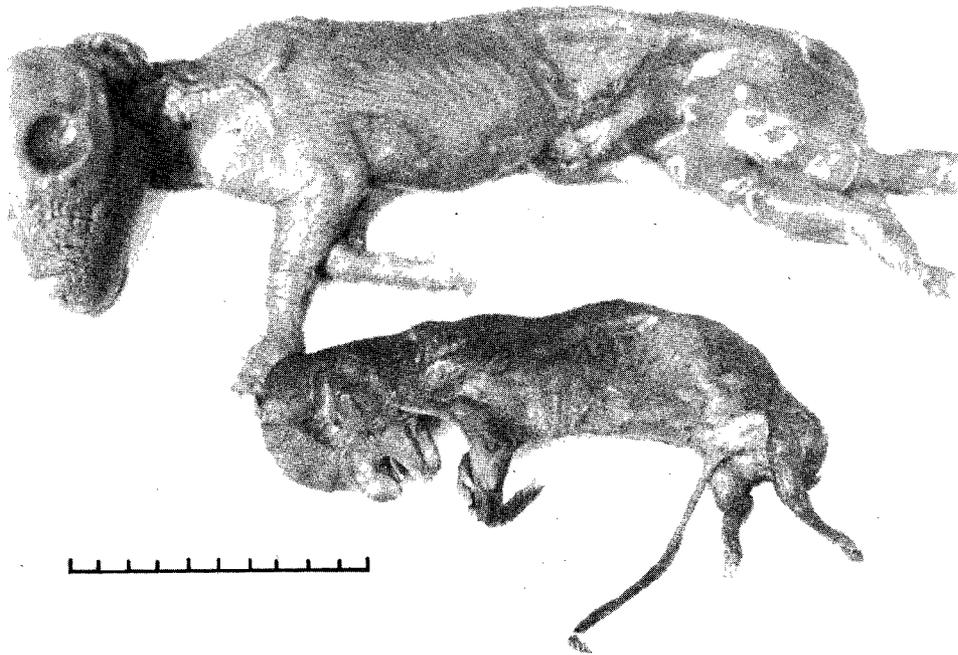


FIG.1. Fetos momificados. Arriba:Feto de 28 cm de longitud, de aprox. 100 días de edad. Abajo: Feto de 17 cm de longitud, de aprox. 70 días de edad. La barra representa 10 cm.

CUADRO 1

Título del HA e IHA obtenidos en los sobrenadantes de los cultivos celulares

Pasaje	Título	Título
1o	0	0
2o	256	0
3o	1,024	512

Los sobrenadantes de las muestras de pulmón e hígado positivas a la HA y a la IME se inocularon en cultivos primarios de células renales de fetos porcinos que fueron colectados del Rastro de Ferrería del D.F. Los riñones fueron transportados en medio de cultivo HLA (Gibco), con antibióticos (20,000 UI de penicilina/ml y 2.0 mg de estreptomycin/ml). La tripsinización se llevó a cabo a temperatura ambiente durante dos h, se ajustaron las células y se cultivaron en botellas de plástico con medio de cultivo HLA adicionado con 0.2 ml de

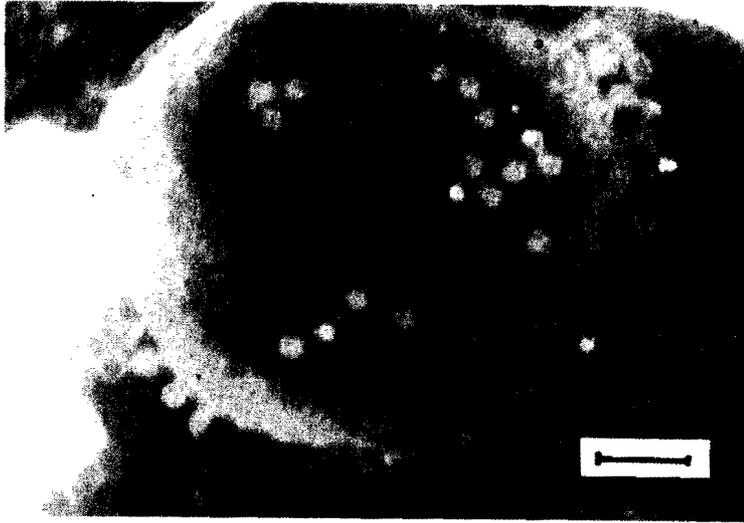


FIG.2. Partículas virales de simetría icosaédrica de aproximadamente 25 nm de diámetro. La barra representa 100 nm.

piruvato al 1.0%, 0.2 ml de L-glutamina al 1.0%, 0.1 ml de bicarbonato de sodio al 3.5% de suero fetal bovino, 10,000 UI de penicilina/ml y 1.0 mg de estreptomocina/ml.

Los monoestratos celulares obtenidos tuvieron tres pasajes como mínimo y antes de infectarlos con PPV sospechoso presentaron cerca del 50% de confluencia. Las células se infectaron con el virus durante 0.5 h a 37°C y se lavaron dos veces con SSF-D antes de adicionar medio fresco. Se incubaron durante 48 h a 37°C, luego se realizaron tres pases ciegos y a los sobrenadantes se les realizó la prueba de HA y los monoestratos celulares se tiñeron con cristal violeta^{1,4,7,12,13}.

RESULTADOS

1. Identificación del parvovirus por hemoaglutinación. De los 26 fetos momificados de alrededor de 70 días de edad, sólo uno, que fue colectado en el rastro, fue positivo a la prueba de HA con un título de 1:32, 768 en hígado y de 1:4, 096 en pulmón. Los títulos se inhibieron hasta en 512 cuando se trataron con un antisero homólogo y conservaron su capacidad hemoaglutinante cuando fueron tratados con éter y cloroformo.

2. Identificación del parvovirus porcino por inmunoelectromicroscopía. La microscopía electrónica de transmisión reveló partículas virales de estruc-

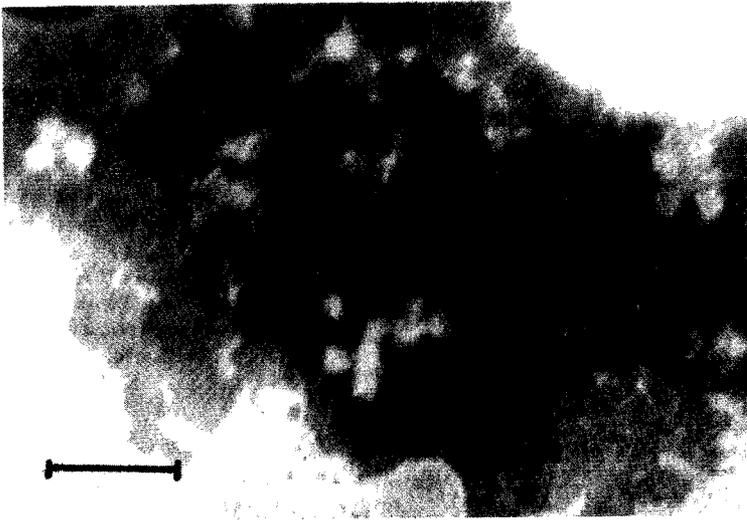


FIG.3. Partículas virales de simetría icosaédrica, aglutinadas con antisuero de parvovirus porcino. La barra representa 100 nm.

tura icosaédrica en las muestras de hígado y pulmón tratadas con antisuero homólogo (Fig. 2 y 3).

3. Aislamiento del parvovirus porcino. En los cultivos celulares de riñón de fetos porcinos se observó que a partir del tercer pasaje ciego, las células presentaron vacuolización del citoplasma después del 6o y 7o día postinoculación comparados con las células sin infectar que conservaron sus características normales. Además presentaron corpúsculos de inclusión intranucleares de color rojizo, cuando se tiñeron con cristal violeta. Los sobrenadantes obtenidos del segundo y tercer pasaje ciego presentaron títulos de HA de 256 y 1,024, que se inhibieron en el segundo pasaje a cero y del tercer pasaje a 512 cuando se trataron con un antisuero homólogo.

DISCUSION

En este estudio se encontró que sólo uno de los 26 fetos momificados trabajados, presentó alto título del PPV por lo que estuvo involucrado en fallas de la reproducción de la cerda^{7,10}.

Trabajos previos realizados en raseros del área metropolitana de la Cd. de México,^{2,3} demostraron la presencia del PPV en un 3.0% de fetos momificados. El bajo porcentaje de PPV encontrado en este tipo de muestras revela que otros agentes infecciosos y no infecciosos que no fueron determinados en este trabajo, pueden estar presentes^{7,15}.

Las dificultades en el aislamiento del virus pueden atribuirse a que: el PPV requiere de cultivos primarios

de células en constante multiplicación,^{1,13} o a que tal vez las partículas virales procedentes de tejidos momificados estaban cerca de la inactivación¹¹.

Desde hace años, los problemas de: abortos, mortinatos, reabsorciones embrionarias, defectos teratológicos y momificaciones fetales se les han asociado a diferentes agentes infecciosos. Sin embargo, a pesar de que el PPV es la causa común de las momificaciones fetales¹⁴, la magnitud del parvovirus porcino no es bien conocido en nuestro país, de ahí la importancia de tomarlo en cuenta en el diagnóstico diferencial de los problemas de fallas de la reproducción en la cerda.

SUMMARY

Twenty six mummified pig fetuses were studied. The fetuses corresponded approximately to 70 days of gestation; from them, only one had hemagglutinating titres higher than 1:4096. The immunoelectronmicroscopy test showed viral particles of icosahedral symmetry of 25 nm diameter. Porcine parvovirus was isolated in primary fetal swine kidney cells from the HA positive mummified fetus as evidenced both by cytopathic effect and a positive hemagglutination-inhibition test with a known antiserum using the cell culture supernatants.

LITERATURA CITADA

- CARTWRIGHT, S.F., LUCAS, M. and HUCK, R.A., 1969. A small haemagglutination porcine DNA virus: I. Isolation and properties. *J. Comp. Path.* 79: 371.
- CIPRIAN, C.A., FLORES, C.R. y HERNANDEZ, B.E., 1982. Detección de parvovirus porcino en fetos momificados colectados en el rastro (reporte preliminar). *Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México 1982*. México, D.F., p. 25.
- CIPRIAN, C.A., BADIOLA, S.I., PUJOLS, R.J. y FLORES, C.R., 1983. Identificación de parvovirus porcino (PPV). *Memorias de la XVIII Reunión anual de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos 1983*. Puerto Vallarta, Jal., p. 32.
- JOHNSON, R.H., 1973. Isolation of swine parvovirus in Queensland. *Aust. Vet. J.* 40: 157.
- JOO, H.S., DONALDSON-WOOD, C.R. and JOHNSON, R.H., 1976a. Rapide diagnostic techniques for detection of porcine parvovirus infection in mummified fetuses. *Aust. Vet. J.* 52: 51.
- JOO, H.S., DONALDSON-WOOD, C.R. and JOHNSON, R.H., 1976b. A standardized hemogglutination-inhibition test for porcine parvovirus. *Aust. Vet. J.* 52: 422.
- JOO, H.S. and JOHNSON, R.H., 1976. Porcine parvovirus: A review. *Vet. Bull.* 46: 653.
- LEMAN, A.D., GLOCK, R.D., MENGELING, W.L., PENNY, R.H.C., SCHOLLE, E. and STRAW, B., (ed.), 1981. Diseases of swine, ed 5. *Iowa State University Press*. Ames Iowa, U.S.A. p. 352.
- MATTHEWS, R.E.F., 1982. Clasificación and nomenclature of viruses. *Intervirology* 17: 72.
- MENGELING, W.L., 1978. Prevalence of a porcine parvovirus induced reproductive failure. An abattoir study. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 172: 1291.
- MENGELING, W.L., CUTLIP, R.C., WILSON, R.A., PARKS, J.B. and MARSHALL, R.E., 1975. Fetal mummification associated with porcine parvovirus infection. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 166: 993.
- MOLITOR, T.W., JOO, H.S. and THACKER, B., 1984. Immunologic molecular and pathogenic properties of KBSH virus. An attenuated strain of porcine parvovirus. *Proc. Int. Pig. Vet. Soc. Congress*, Ghent, Belgium. p. 10.
- SHAHABADI, M.S., LYNCH, J., CHO, H.J. and MARUSYK, R.G., 1982. Studies on the multiplication of a porcine parvovirus. *Vet. Microbiol.* 7: 117.

14. THACKER, B., LEMAN, A.D., HURTGEN, T.P., SAUBER, T.E. and JOO, H.S., 1981. Survey of porcine parvovirus infection in swine fetuses and their dams at a Minnesota abattoir. **Am. J. Vet. Res.** 42: 865.
15. URSACHE, R. et VALLET, C., 1984. L'infection a parvovirus chez le porc. Sondage serologique en france 1977-1982. **Rev. Med. Vet.**
16. VANNIER, P., LEUNEN, J. et TILLON, J.P., 1977. Le parvovirus et les troubles de la reproduction chez le porc, étude clinique et serologique, consequences. **Institut Techniques de Por.** 153.