



PRIMER AISLAMIENTO DEL PARVOVIRUS CANINO TIPO 2 EN CHILE

FIRST ISOLATION CANINE PARVOVIRUS TYPE 2 IN CHILE

Cerda D. Luz, Espiñeira C. Constanza, Quinteros C. Guillermo. Servicio Agrícola y Ganadero (uz.cerda.gob.sag.cl), Universidad Santo Tomás.

INTRODUCCION: El objetivo principal de este estudio es el aislamiento del parvo virus canino tipo 2 (PVC2), por primera vez en Chile. Para ello se utilizaron distintos tipos de líneas celulares CFRK y MDCK, a fin de comparar la eficiencia del virus en el proceso de infección y multiplicación intra celular. Como segundo propósito de estudio fue establecer una serie de diagnósticos tanto a nivel de screening e individuales aplicables en la clínica que sean confirmatorios de esta patología.

Por último, el tercer objetivo consistió en realizar un análisis entre manifestaciones clínicas, relacionadas con la evolución del desarrollo de la patología con observaciones de la acción viral y respuesta inmunológicas en cada uno de los animales enfermos, muestreados, considerando factores medio ambientales que inciden en la presentación del cuadro.

MATERIALES Y METODOS: Este trabajo se llevó a cabo entre los años 2003 y 2004, en los laboratorios de Virología y Cultivos Celulares del SAG y el Instituto Milenium de la Universidad de Chile, en donde se efectuó la microscopía electrónica. Se muestrearon 11 perros de diferentes edades, clínicamente sospechosos de sufrir parvovirus, con manifestación de cuadros diarreicos hemorrágicos, vómitos abundantes, deshidratación severa, fiebre sobre 39.8°C, decaimiento y marcado compromiso general; provenientes de distintas comunas de los sectores sur-poniente de la región metropolitana.

Se tomaron muestras de fecas directas e hisopados anales y muestras de sangre con EDTA. a fin de procesarlas para proceder al aislamiento viral en cultivos de células de las líneas MDCK, (riñón de perro) y CRFK (riñón de gato). Estas líneas celulares se sembraron en concentración de 5×10^5 cél/ml y se cultivaron periódicamente para luego inocularlas a partir de las muestras tratadas con antibióticos. Se centrifugaron a 2000 rpm por 10 minutos. a 4 ° C, para obtener los sobrenadantes que constituyen el inóculo y de la costra flogística originada de la muestra de sangre obtenido mediante centrifugación. Se realizan tres pases sucesivos de inoculaciones en las células hasta pesquisar claramente el efecto viral sobre el monoestrato celular, "efecto citopático", (ECP). Como control viral se inocula los mismos tipos de células con PVC2 de referencia Ames, Iowa, catálogo K35. Como controles negativos se dejan células sin inocular. Las muestras son incubadas por 48 hrs. a 37° C, con una atmósfera de 5% de CO₂ y 93 % de humedad relativa.

Para corroborar el diagnóstico efectuado de los aislados virales, se neutralizan con suero hiper anti específico, logrado por la inoculación sucesiva intraperitoneal cada siete días, conejos de 2 meses de edad, con dosis crecientes (100 a 1.000.000 DI50) de PVC2 de cepa de referencia. Suero que es titulado para determinar la concentración de uso.

Detección del virus por aplicación de la técnica de cuerpos de inclusión intranucleares (Cuming,1975), mediante la tinción de hematoxilina-eosina y fijación en formalina al 10 % por 4 hrs. de las células inoculadas que presentaron marcado ECP inducido por el virus aislado, proveniente de cada uno de los animales enfermos.

Pesquisa viral basada mediante la aplicación de la prueba de hemoaglutinación. El virus provoca aglutinación de los eritrocitos porcinos por la presencia de hemoaglutininas de superficie afines por los glóbulos rojos de esta especie. Los eritrocitos son suspendidos en solución alsever con anticoagulante en proporción 1:1. Luego son centrifugados y lavados en solución buffer fosfatada. Se ensayan diferentes concentraciones de uso 1%, 0.75% y 0.5%, hasta establecer la óptima.

Microscopía electrónica aplicada para visualizar el virus, realizada bajo el desarrollo del siguiente protocolo de centrifugaciones diferenciales de 2000 y 6500 rpm y posteriormente ultra centrifugación a 20.000 rpm a 4° C por 10 minutos. Tinción del sedimento con acetato de uranilo al 2%, montaje en las grillas y observación al microscopio electrónico, para detectar partículas virales de 20 nm icosaédrica.

RESULTADOS Y DISCUSION: La línea celular que mostró mayor sensibilidad para la multiplicación viral correspondió al la línea CRFK. En un 50% de los animales pudo aislarse el PVC2, visualizado por la producción de ECP consistente en la aparición de procesos proteolíticos con alteración del estrato celular, con marcada deshidratación celular, aparición de vacuolas citoplasmáticas. A nivel nuclear hay condensación de la cromatina con fragmentación de los núcleos. Estas alteraciones morfológicas son originadas por los cambios metabólicos de la célula, llevando a desordenes en la permeabilidad de la membrana citoplasmática, invaginándose originando vacuolas con fagocitosis de ella por parte de los viriones, hasta ser liberados al interior de la célula, con pérdida de ribosomas, lo que imposibilita la síntesis de la membrana celular, ocurriendo finalmente la apoptosis de la célula. (Covadonga, 2002) Los restantes ECP visualizados no correspondieron al provocado por el agente en estudio, puesto que el daño en la morfología celular no es el descrito para este virus (Carman,1985; Pollock y Carmichael,1992),y además no fueron neutralizados cuando se enfrentaron con el suero hiper anti específico.

Los cuerpos de inclusión intra nucleares se observaron en 5 de las 6 muestras positivas, lo que obedece probablemente al período de toma de la muestra, que ocurrió al cuarto día de presentada la sintomatología, y por tanto la excreción viral fue menor, lo que incide en una menor carga viral para ser aislada. En relación a la prueba de hemoaglutinación se estableció óptimas respuestas al aplicar un protocolo con una concentración de eritrocitos porcinos de 0.75%, en donde el total de los aislados virales de PVC2 hemoaglutinaron. Se confirmó el aislamiento del PVC2 en células, a través de la aplicación de la microscopía electrónica, en donde se observó claramente las partículas virales de 20nm de diámetro y de morfología icosaédrica como se describe en la literatura científica, (Doane y Anderson,1987) . En relación al aspecto clínico, desarrollo de la patología, pesquias virológicas e inmunológicas, pudo observarse que el comportamiento de las muestras depende directamente del momento de toma de ésta, del inicio del cuadro, antecedentes vacunales previos y presencia de anticuerpos maternos. El mayor título viral y hemoaglutinante, presencia de gran cantidad de cuerpos de inclusión, se lograron cuando las muestras se obtuvieron antes de la manifestación severa de la sintomatología, es decir durante la incubación viral; Los bajos títulos virales ocurren cuando se da paso a la formación de anticuerpos locales y por tanto dificulta la

multiplicación del virus in vitro.

CONCLUSIONES: -Se logra aislar el PVC2, más eficientemente en las células CRFK, el que es neutralizado por el desarrollo de un suero anti específico. -Se establece un protocolo para la técnica de hemoaglutinación, no descrito en la literatura, para ser aplicado como prueba screening. -Se confirma el aislamiento de PCV2 por microscopía electrónica. -Las manifestaciones de agresividad del cuadro clínico, están dadas principalmente por el estado inmunitario, edad de los perros y condiciones nutricionales al momento de la infección. -Pudo observarse la presentación de otros virus aislados, que no fueron neutralizados por el suero hiper, lo que implica que muchas veces se diagnostica falsamente la enfermedad, en base sólo al criterio clínico. Con este estudio surge la alternativa de un diagnóstico específico, fácilmente aplicable en nuestro medio

REFERENCIAS:

Covadonga, Alonso. 2002. Regulación de la apoptosis por los virus, Departamento Biotecnología, Valdeolmos, España.

Cuming, H. 1975. Virología en Cultivos de Tejidos. Ed. Manual Moderno, pp.76-77

Doane, F. y Anderson, N. 1987. Microscopía Electrónica in Diagnostic Virology. Cambridge University Press. NY, USA.

Pollock, R., Carmichael, L. 1993. Enteritis Viral Canin. En: Green, C.E.: Microbiología Veterinaria. 1° ed. México editorial Interamericana McGraw-Hill. p.280-287.

[Portada/](#) [Indice](#) [Contacto/](#) [Imprimir](#)
[Posters/](#)

SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO / DIVISION DE PROTECCION PECUARIA / BOLETIN VETERINARIO OFICIAL / SALUD E INOCUIDAD DE LOS ALIMENTOS