

Universidad Nacional Autónoma de México

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES CUAUTITLÁN

MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



EVALUACION DE DIVERSOS METODOS EMPLEADOS EN EL DIAGNOSTICO DE LA GASTROENTERITIS TRANSMISIBLE DE LOS CERDOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

ALBERTO ENRIQUE ESTRADA CORREA

México, D. F.

1979



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Índice general :

I. Introducción	1
II. Objetivos	6
III. Materiales y Métodos	7
Cepa de exposición	
Animales	
1. Aislamiento del virus GTC por medio de la inoculación de lechones susceptibles	
a) Inoculación de lechones provenientes de cerdas no inmunes	
b) Inoculación de lechones provenientes de cerdas inmunes	
2. Observación de signos clínicos	
3. Observación de las lesiones macroscópicas del intestino delgado a la necropsia	
4. Histopatología de segmentos intestinales	
5. Prueba bioquímica de la enzima lactasa	
6. Estudios de inmunofluorescencia	
a) Elaboración de un conjugado	
b) Electroforesis en tiras de celogel	
c) Inmunoelectroforesis	
d) Preparación de polvo de hígado e intestino para absorber el conjugado	
e) Titulación del conjugado en cortes de intestino infectado y en cultivos celulares	
f) Técnica de tinción para inmunofluorescencia	
g) Procesamiento del intestino para el diagnóstico por inmunofluorescencia	
7. Estudios de microscopía electrónica	
Diagnóstico diferencial de GTC y Colibacilosis	
IV. Resultados	16
V. Discusión	34

VI. Conclusiones	41
VII. Resumen	42
VIII. Referencias	44

Indice de cuadros y figuras :

Cuadro 1. Aislamiento del virus de la GTC en lechones de un día de edad provenientes de una granja libre de GTC	21
Cuadro 2. Aislamiento del virus de la GTC en lechones de un día de edad provenientes de cerdas inmunes	22
Cuadro 3. Signos clínicos de 60 lechones inoculados con el virus GTC	23
Cuadro 4. Lesiones macroscópicas y microscópicas del intestino delgado de lechones inoculados con virus GTC	24
Figura 1. Media de la temperatura corporal de 14 lechones inoculados al día de edad con el virus de la GTC	25
Figura 2. Peso promedio de 10 lechones inoculados con virus de la GTC	26
Figura 3. Resultados de la prueba de la lactasa efectuada a segmentos de intestino delgado en lechones inoculados con el virus GTC	27
Figura 4. Resultados de la cromatografía de intercambio iónico (DEAE-celulosa) efectuado al precipitado de sulfato de amonio 50 %, de un suero de cerdo anti-virus de la Gastroenteritis Transmisible de los cerdos	28
Figura 5. Patrones obtenidos en electroforesis en celogel de un suero de cerdo hiperinmunizado con virus de la GTC, la fracción precipitada con sulfato de amonio al 50 % y la fracción I obtenida con DEAE-celulosa	29
Figura 6. Resultados de las pruebas de inmunoelectroforesis efectuadas a un suero de cerdo hiperinmunizado con virus de GTC y a las fracciones I y II obtenidas por DEAE-celulosa	30

- Figura 7. Microfotografía electrónica del virus GTC en el citoplasma de una célula epitelial** 31
- Figura 8. Microfotografía electrónica del virus GTC en el exterior de las microvellosidades intestinales** 32
- Figura 9. Microfotografía electrónica del virus GTC en proceso de formación dentro de una vacuola citoplásmica** 33

I. Introducción

La gastroenteritis transmisible de los cerdos (GTC) fue descrita por vez primera por Doyle y Hutchings (1946) quienes además determinaron su etiología viral. En México la enfermedad fue reportada por primera ocasión en el año de 1965 por el Laboratorio Central de Diagnóstico de Palo Alto en un brote en el estado de Michoacán y en 1970 el virus fue aislado a partir de brotes en la Ciudad de México y en San Martín Texmelucan, Puebla (Olguín, 1970).

La gastroenteritis transmisible de los cerdos es una enfermedad infecciosa, altamente contagiosa, la cual afecta principalmente a lechones de hasta dos semanas de edad. La enfermedad se caracteriza por una severa diarrea de color amarillento, vómito, deshidratación y muerte. El período de incubación varía de 14 a 72 horas. En animales adultos la enfermedad es benigna presentándose anorexia, vómito, ligera diarrea que dura de 3 a 4 días y agalactia, siendo la mortalidad nula.

El agente etiológico de la enfermedad ha sido incluido como un miembro del grupo de los Coronavirus debido al tipo de ácido nucleico (ARN), a su morfología que presenta proyecciones, replicación dentro del citoplasma celular y por las características bioquímicas tales como la sensibilidad al éter y al cloroformo (Bradburne y Tyrrel, 1971).

La ruta más efectiva para la entrada del virus a los cerdos es la vía oral, sin embargo, infecciones por medio de aerosoles han sido descritas (Reber, 1955). El virus ha sido recobrado en altos títulos de las mucosas intestinal y nasal, tonsilas, tráquea, pulmón, riñón y en bajos títulos de otros órganos y de la sangre (Young y col., 1955; Cartwright, 1966;

Harada y col., 1969). El virus ha mostrado habilidad para resistir el pH del estómago (Bohl y Kumagai, 1965) y la acción de la tripsina (Cartwright, 1966), lo que lo hacen adecuado para infectar al tracto gastrointestinal; debido a que el virus es inactivado por solventes de lípidos y por el desoxicolato de sodio, no crece en la parte anterior del duodeno y se replica rápidamente en la parte posterior del duodeno, yeyuno e ileon, pero no crece en el estómago o en el colon (Haelterman, 1972).

El virus se multiplica en las células epiteliales columnares del intestino delgado en un lapso de 4 a 5 horas, posteriormente invade otras células, ocurriendo el ciclo varias veces llegando a provocar la atrofia de las vellosidades y la modificación del epitelio de columnar a cuboidal (Haelterman, 1972). Estas alteraciones producen una baja funcionalidad de las células para producir ciertas enzimas que son importantes en la digestión y en el transporte celular de nutrientes. Hooper y Haelterman (1966) no detectaron actividad de la enzima lactasa en segmentos intestinales con atrofia de vellosidades y además encontraron una disminución en la actividad de las fosfatasas ácida y alcalina, de la adenosín-trifosfatasa, deshidrogenasa succínica y de las esterasas no específicas. De acuerdo con Cornelius y col. (1968) la causa de la muerte es debida a una deshidratación, acidosis metabólica y a una disfunción cardiaca provocada por una hipercalemia. Debido al incremento de potasio y nitrógeno uréico en la sangre probablemente ocurran alteraciones en la función renal.

Por lo que toca a las lesiones que se observan a la necropsia, la mayoría de éstas se encuentran confinadas en el tracto gastrointestinal. Bay y col. (1951) observaron hipermia, pequeñas áreas hemorrágicas en la zona diafragmática del estómago y necrosis de la

mucosa gástrica, aunque éstas lesiones no son un hallazgo constante, se ha llegado a reportar que alrededor del 50% de lechones infectados con el virus las presentan (Goodwin y Jennings, 1959; Hooper y Haelterman, 1966). En el intestino delgado las lesiones observadas consisten en edema (Yusken y col., 1959) y acortamiento o destrucción de las vellosidades del yeyuno e ileon (Trapp y col., 1966), éstas lesiones han sido consideradas como características de GTC (Haelterman y Pensaert, 1967; Pensaert y col., 1968; Cross y Bohl, 1969). En la mayor parte de las ocasiones el intestino delgado se encuentra distendido y se observa la presencia de un líquido amarillento y gas en la luz intestinal. La pared intestinal se observa transparente, probablemente debido a la atrofia de las vellosidades (Bohl, 1975).

En relación a los cambios microscópicos que se encuentran en los órganos, Okaniwa y col. (1959) describieron picnosis, kariorexis, necrosis y descamación de las células epiteliales del estómago, sin embargo, éstos cambios son variables y en ocasiones no se presentan (Okaniwa y Maeda, 1966). Las lesiones en la mucosa y submucosa intestinal consisten en áreas de necrosis cerca del píloro demarcadas por una densa zona de leucocitos, además se observa congestión de la lámina propia, inflamación de las puntas de las vellosidades, vacuolización de las células epiteliales y necrosis (Faenstra y col., 1948; Whitehair y col., 1948; Bay y col., 1951; Lee y col., 1954; Goodwin y Jennings, 1959). Trapp y col. (1966) reportaron que durante la infección, las vellosidades del duodeno se notaron acortadas pero no destruidas, y las vellosidades del yeyuno estaban acortadas, destruidas y muchas se encontraban fusionadas; las criptas y glándulas no se encontraron afectadas. Se observó una

degeneración hidrópica en las células epiteliales, algunas células aparecían escamosas con los bordes estriados y reducidos en su altura. Células mitóticas fueron observadas en las glándulas y criptas. Hoeltermann y Pensaert (1967) asociaron la atrofia de las vellosidades con los cambios degenerativos de las células columnares. Hooper y Hoeltermann (1969) realizaron observaciones acerca de la altura de las vellosidades del yeyuno, en las cuales éstas se encontraban reducidas en una relación de 7:1 en lechones normales, a 1:1 en lechones infectados, esto comparando la altura de las vellosidades en relación a las criptas. Las células que cubren a las vellosidades atrofiadas se encontraban aplanadas o cuboidales y sus bordes no estaban bien definidos; ellos encontraron muy pocos cambios inflamatorios en el tracto gastrointestinal en todos los estadios de la infección. Waxler (1972) estudió las lesiones que ocurrían en la GTC utilizando el microscopio electrónico de barrido y describió una marcada atrofia de las vellosidades en el yeyuno e ileon con menos cambios patológicos en el duodeno. En el intestino grueso no se observan cambios histopatológicos; cambios degenerativos renales se observan en los túbulos contorneados, ocasionalmente se encuentra activación del sistema retículo endotelial en los nódulos linfáticos y en el bazo (Okaniwa y Maeda, 1966).

Con respecto al diagnóstico de la GTC, éste es difícil de efectuar siendo importante diferenciar ésta enfermedad de otras entidades patológicas que provocan cuadros diarréicos en lechones (Hooper y Hoeltermann, 1969). De estos, se considera a la Colibacilosis como la que más fácilmente se confunde con GTC; otras enfermedades que pueden ser confundidas son la enterotoxemia debida al Clostridium perfringens tipo C, y recientemente se

ha reportado como causa importante de cuadros diarreicos en lechones a un miembro del grupo de los Rotavirus (Torres, 1978; Underdahl, 1978; Woodes, 1978).

Por lo que respecta a la situación de la GTC en México, los estudios epizootiológicos indican que se encuentra bastante difundida. Según reportes consignados en el Boletín Zoosanitario de la Red Nacional de Laboratorios de Diagnóstico, entre los años de 1969 a 1976 se encontraron 168 brotes de la enfermedad en 10 diferentes estados de la República. La época del año en que aparece la GTC, de acuerdo con el Boletín Zoosanitario, corresponde entre los meses de octubre y abril, siendo en marzo el mes en que se registran más casos. En México, el diagnóstico de la GTC se realiza por medio de observaciones clínicas, histopatología y en ocasiones inmunofluorescencia, sin embargo los métodos no están bien establecidos por lo que el diagnóstico se ha dificultado considerablemente.

II. Objetivos

1. Evaluación de diversos métodos que han sido recomendados en el diagnóstico de la GTC.
2. Dilucidar cual es el método o los métodos más apropiados para realizar ese diagnóstico.
3. Determinar los métodos que puedan tener una aplicación práctica para la porcicultura nacional.
4. Proporcionar una metodología que pueda ser empleada por los diversos laboratorios de diagnóstico del país.

III. Material y Métodos

Cepa de exposición

Virus de Gastroenteritis Transmisible de los cerdos (GTC), cepa Texcoco aislada en lechones a partir de un brote de campo por el Dr. Antonio Morillo y Carlos R. Bautista en 1977. La cepa ha sido mantenida a través de pases en lechones. El virus tiene un título de 10^3 dosis infectantes por ml, inoculado por vía oral a lechones de un día de nacidos (10^3 /DV/ml/oral/lechón/un día).

Animales

Se utilizaron 60 lechones de un día de edad que se mantuvieron en cajas de incubación a una temperatura promedio de 28°C por medio de focos de 40 watts. La alimentación consistió de una dieta a base de leche de vaca, huevos, mezcla de minerales y antibióticos.

Se probaron siete diferentes técnicas empleadas en el diagnóstico de la GTC:

1. Aislamiento del virus GTC por medio de la inoculación de lechones susceptibles

a) Inoculación de lechones provenientes de cerdas no inmunes. - A partir de lechones que presentaban un cuadro diarreico se hizo una suspensión al 10% del intestino delgado en una solución balanceada de Hank y se centrifugó a 10,000 R.P.M. durante 15 minutos a una temperatura de 4°C. El sobrenadante fue sembrado en un medio de agar-sangre para descartar la presencia de bacterias. Se obtuvieron 7 lechones de un día de edad de dos camadas de cerdas provenientes de granjas libres de GTC, los lechones a las 16 horas después

de la separación de la madre fueron inoculados con 1 ml. de la suspensión del virus administrado por vía oral; posteriormente fueron observados los signos clínicos.

b) Inoculación de lechones provenientes de cerdas inmunes.- Se obtuvieron 53 lechones provenientes de cerdas inmunizadas contra el virus GTC, los lechones a las 16 horas después de la separación de la madre fueron inoculados con 1 ml. de la suspensión del virus administrado por vía oral. Los signos clínicos fueron observados.

2. Observación de signos clínicos

A cada lechón inoculado se le determinó, a intervalos de cada 4 horas, la presencia de cada uno de los signos clínicos característicos de la GTC como son diarrea, vómito, deshidratación erizamiento del pelo, decaimiento y muerte; igualmente fueron anotadas las temperaturas rectales y el peso de los lechones antes de la inoculación del virus y poco antes de la muerte.

3. Observación de las lesiones macroscópicas del intestino delgado a la necropsia

Una vez sacrificados los animales, por medio de choque eléctrico, se determinaron las lesiones macroscópicas intestinales. Para determinar la presencia de las vellosidades intestinales se tomaron segmentos del yeyuno, los cuales fueron colocados en cajas de Petri conteniendo agua, junto con segmentos similares de lechones no inoculados para establecer la diferencia. Las vellosidades eran observadas con una lupa de aumento (Giles y col., 1977).

4. Histopatología de segmentos intestinales

Se tomaron muestras de segmentos de yeyuno, los cuales fueron fijados en formol al 10% y posteriormente efectuados los cortes con el método habitual de muestras incluidas en

parafina, por medio del microtómo. Los cortes efectuados fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina.

5. Prueba bioquímica de la enzima lactasa

Esta prueba fue efectuada para determinar el grado de actividad de la enzima lactasa. Se tomaron segmentos intestinales y fueron colocados en tubos de ensaye que contenían una solución de lactosa al 2%, se incubaron a una temperatura de 37°C durante una hora, se tomó una gota de la suspensión y fue colocada en tiras reactivas para medir glucosa en sangre (Destroxtix, Labs. Miles). La actividad de la enzima para desdoblar la lactosa se determinó al comparar las tiras reactivas con el patrón de la cantidad de glucosa (Giles y col., 1977).

6. Estudios de inmunofluorescencia

a) Elaboración de un conjugado.- A un cerdo de 8 meses de edad se le administró virus GTC por vía oral (30 ml.) y por vía intramuscular (20 ml.), 15 días después de ésta primera inoculación se le volvió a administrar el virus dando 20 ml. por vía oral y 20 ml. por vía intramuscular. Al mes de ésta segunda inoculación se sangró al animal por medio de punción venosa, la sangre colectada se dejó coagular a 37°C durante 2 horas y toda la noche a 4°C, posteriormente se obtuvo el suero el cual fue clarificado por centrifugación a 5,000 R.P.M. durante 20 minutos a 4°C. El suero fue precipitado dos veces con una solución saturada de sulfato de amonio pH 7.0 a partes iguales; las globulinas precipitadas fueron dializadas a 4°C contra un buffer de fosfatos pH 6.8, 0.02 M., efectuándose dos cambios (Kawamura, 1976).

La fracción gammaglobulina una vez dializada fue pasada a través de una columna de cromatografía de intercambio iónico conteniendo DEAE-celulosa (Labs. Serva), equilibrada con un buffer de fosfatos pH 6,8, 0,02 M. Una vez aplicada la muestra se utilizó este mismo buffer para eluir la fracción enriquecida de IgG. Por medio de una bomba peristáltica se obtuvo la fracción I a razón de 5 ml. por cada 20 minutos. El resto de la proteína unida al DEAE eluida con NaCl, 1 M y construyó la fracción II. La proteína fue determinada por medio de un espectrofotómetro (modelo Hitachi) a 280 nm. de longitud de onda; una vez obtenida la fracción I se dializó contra solución salina durante 12 horas (Wood, Thompson y Goldstein, 1976).

La fracción I fue conjugada a razón de 0,025 mg. de isotiocianato de fluoresceína por mg. de proteína a pH 9,6 por espacio de dos horas a temperatura ambiente. Una vez efectuada la conjugación se separaron las inmunoglobulinas conjugadas del isotiocianato de fluoresceína libre por medio de una columna de Sephadex G-25 equilibrada con una solución salina bufferada (PBS) pH 7.2. El conjugado fue dializado contra PBS y posteriormente puesto en alícuotas y congelado a -20°C hasta su utilización (Konishi y Bankowski, 1967).

b) Electroforesis en tiras de celogel.- Se determinaron los patrones electroforéticos al suero completo hiperinmune, al precipitado con sulfato de amonio y a la fracción I obtenida con DEAE-celulosa. Se hizo electroforesis en celogel, utilizando un buffer de veronal 0,04 M. pH 10,0 durante 60 minutos a 200 voltios de corriente. Las bandas fueron teñidas con Poinceau-S, transparentizadas y leídas en un densitómetro (Gelman).

c) Inmunolectroforesis. - Se prepararon portaobjetos cubiertos con 3 ml. de agar al 1% en buffer de alta resolución (Labs. Sigma) pH 8.6 y fuerza iónica de 0.05. El suero completo de cerdo, la fracción I y la fracción II de las globulinas pasadas por DEAE-celulosa, fueron corridos en el aparato de electroforesis a razón de 6 miliamperes por laminilla, utilizando el mismo buffer de alta resolución en los tanques del aparato. Como indicador del movimiento de las proteínas se utilizó una solución de negro de amido al 7%. Una vez efectuada la electroforesis, para desarrollar las bandas de precipitación, se puso en el canal central un antisuero contra el suero total de porcino preparado en conejo. Las laminillas fueron colocadas en cámaras húmedas efectuándose la lectura a las 24 y 48 horas; para hacer más clara la lectura, se tiñeron con negro de amido, para lo cual las laminillas se lavaron con PBS durante 24 horas y con agua destilada por otras 24 horas, se dejaron secar a temperatura ambiente, efectuándose posteriormente la tinción, decolorándose después con baños de ácido acético al 7%. Una vez clarificadas las laminillas se dejaron secar cubriéndose posteriormente con esmalte para uñas (Hudson y Hay, 1976).

d) Preparación de polvo de hígado e intestino para absorber el conjugado. - Se tomaron fragmentos de hígado y segmentos de intestino de cerdo normal, los cuales fueron congelados a -20°C y posteriormente cortados en pequeños pedazos y puestos en una licuadora conteniendo PBS hasta su total trituración; ésta suspensión fue centrifugada a 5,000 R. P. M. durante 30 minutos, descartándose el sobrenadante y filtrándose el sedimento a través de un gasa para eliminar partículas gruesas y tejido conectivo; posteriormente se agregó acetona para extraer los lípidos, colocándose el tejido en un embudo de Buchner con papel filtro para eliminar la acetona por medio de vacío, dejándose secar posteriormente el polvo de tejido y pulverizán-

dose en un mortero. Para la absorción del conjugado se utilizaron 10 mg. de polvo de hígado e intestino por cada ml. de conjugado sin diluir, dejándose absorber a 4°C. El sobrenadante constituyó el conjugado absorbido (Coons, Leduc y Kaplan, 1976).

e) Titulación del conjugado en cortes de intestino infectado y en cultivos celulares.- Se hicieron diluciones dobles del conjugado en PBS pH 7.2 y posteriormente fueron aplicadas a cortes de intestino infectado y normal para su tinción. El título se consideró la dilución máxima de conjugado en el cual se podía apreciar fluorescencia específica. Para evaluar el conjugado en cultivos celulares, se utilizó la cepa del virus Miller-HP que está adaptada a cultivos celulares. Este virus fue inoculado a una línea celular de testículo de cerdo (ST) mantenida en tubos de Leighton. Una vez que apareció el efecto citopático en los cultivos celulares, se procedió a la tinción de los cultivos utilizando el conjugado específico contra GTC, se hicieron diluciones dobles del conjugado con PBS y se evaluó la inmunofluorescencia específica de las células infectadas.

f) Técnica de tinción para inmunofluorescencia.- Los cortes de tejido intestinal o las laminillas de cultivos celulares infectados, fueron fijados en acetona a temperatura ambiente por 10 minutos; una vez secas las laminillas se les colocó una gota de conjugado debidamente titulado. Las laminillas fueron puestas en incubación, en cámara húmeda, durante 30 minutos y posteriormente fueron lavadas con PBS durante 10 minutos efectuándose dos cambios y con agua destilada por 5 minutos; una vez seco el tejido fue cubierto con glicerina bufferada pH 7.2 colocándose un cubreobjetos a cada laminilla. Los tejidos fueron observados en un microscopio de fluorescencia Leitz Ortholux, utilizando los filtros BG-12 y K-510.

g) Procesamiento del intestino para el diagnóstico por inmunofluorescencia.- Se ensayaron 4 formas de procesar el intestino:

1) Se congelaron segmentos intestinales a una temperatura de -70°C poniéndolos en un congelador (Revco), posteriormente se hicieron cortes de un grosor de 6 micras por medio del criostato (marca Ames), protegiendo el tejido con Tissue Tek (Labs, Ames), a una temperatura de -30°C .

2) Se efectuó un congelamiento inmediato del intestino, protegido por Tissue Tek, empleando nitrógeno líquido, efectuándose después los cortes a 6 micras por medio del criostato a una temperatura de -30°C (Goldman, 1968).

3) Se intentó la inclusión de segmentos intestinales en parafina siguiendo la técnica de Pospisil y col. (1969) y Peters y Coons, (1976) para anticuerpos fluorescentes. Para esto, segmentos intestinales fueron colocados en etanol al 95% a 4°C durante 24 horas, posteriormente se deshidrató el tejido en 4 cambios de alcohol absoluto a la temperatura de 4°C ; se clarificaron las muestras en baños de xilol a 4°C , efectuándose 3 pases; seguidamente los tejidos fueron puestos en 4 baños consecutivos de parafina a 56°C . Los cortes del tejido fueron hechos con la técnica usual de muestras incluidas en parafina por medio del microtomo. Para la eliminación de la parafina de los tejidos montados en portaobjetos, éstos fueron colocados en baños de xilol, removiéndose posteriormente el xilol con baños de etanol al 100%, y ésta a su vez fue removido con baños de PBS, quedando las muestras listas para efectuar la tinción inmunofluorescente

4) Se hicieron improntas de mucosa intestinal, para ésto se abrió un segmento del yeyuno, se puso sobre un aplicador de madera y se hicieron improntas por contacto con un portaobjetos, se fijaron en acetona durante 10 minutos a una temperatura de -20°C , siguiendo posteriormente la técnica de tinción para inmunofluorescencia.

En todos los casos se siguieron los mismos procedimientos utilizando intestinos de lechones normales para ser utilizados como controles.

7. Estudios de microscopía electrónica

Con objeto de evaluar la utilización del microscopio electrónico en el diagnóstico, se tomaron muestras de yeyuno de 4 lechones que habían sido inoculados 72 horas antes con el virus GTC, así como de un lechón control no inoculado. Las muestras fueron tomadas inmediatamente después del sacrificio, los segmentos fueron cortados de un cm. de longitud y en seguida puestos a fijar por inmersión en una solución de glutaraldehído al 3% diluída en un buffer de fosfatos pH 7.4 durante 3 horas. Las muestras fueron postfijadas en una solución de tetróxido de osmio al 1% diluída en un buffer de fosfatos pH 7.4 durante 2 horas. Los tejidos fueron deshidratados en concentraciones crecientes de etanol y posteriormente embebidos en una resina (Araldita, Lab. Laad Research Industries). Por medio del ultramicrotómo, se efectuaron cortes finos de 400 a 600 Å , los cuáles fueron colocados en rejillas de cobre para su posterior tinción con acetato de uranilo (Nunn, 1970). Las muestras fueron examinadas al microscopio electrónico (modelo EM-300, Philips Electronic Instruments).

Diagnóstico diferencial de GTC y Colibacilosis

Se utilizó la cepa K-87 de Escherichia coli, de la cual se desconocían los antígenos somáticos y flagelares. Esta cepa fué amablemente proporcionada por el P. M. V. Z. J. A. de la Higuera del Departamento de Bacteriología del I. N. I. P. Las bacterias fueron estandarizadas a una concentración de 1.12×10^{14} de unidades formadoras de colonias (U.F.C.) por ml. Se inocularon 4 lechones de un día de edad, administrando por vía oral a cada lechón 4 ml. de la suspensión. A cada lechón se le determinaron los signos clínicos, la temperatura rectal, el peso corporal, las lesiones macroscópicas y microscópicas, la prueba de la lactasa y se tñieron segmentos de Intestino con anticuerpos fluorescentes contra GTC.

IV. Resultados

En relación a los resultados del aislamiento del virus GTC en lechones provenientes de cerdas no inmunes se observó que a las 16 horas después de la inoculación del virus todos los lechones inoculados presentaban vómito y diarrea que persistió hasta el tercer día de la inoculación en que se sacrificaron los animales ya que estaban moribundos. Los animales controles, no inoculados, en ningún momento presentaron signos de diarrea o vómito (CUADRO 1). Con respecto a los resultados del aislamiento del virus GTC en 53 lechones provenientes de cerdas inmunes, éstos fueron semejantes a los obtenidos con lechones provenientes de cerdas no inmunes (CUADRO 2). En ningún caso crecieron bacterias del sobrenadante de la suspensión viral una vez centrifugada.

Los signos clínicos que fueron observados en 60 lechones inoculados con el virus GTC consistieron en diarrea profusa, vómito que declinaba en los estadios finales de la enfermedad, deshidratación, erizamiento del pelo, decaimiento, postración y muerte (CUADRO 3).

En 14 lechones inoculados con el virus GTC se observó que durante el curso de toda la enfermedad la temperatura rectal se mantuvo en un promedio de 39°C, declinando la temperatura a 36°C solamente poco antes de la muerte (FIGURA 1).

El peso promedio encontrado en 10 lechones fue de 1250 gramos, antes de la inoculación del virus GTC al día de edad; 4 días después de la inoculación del virus los animales tuvieron un peso promedio de 900 gramos. Por otra parte, los lechones controles con un peso inicial promedio de 1250 gramos, a los 4 días de edad tuvieron un peso promedio de 1850 gramos (FIGURA 2).

Respecto a las lesiones encontradas a la necropsia, en el estómago casi siempre se encontró leche coagulada en su interior, así como congestión de la mucosa y en ocasiones úlceras. Los cambios patológicos a nivel intestinal fueron localizados esencialmente a nivel de yeyuno e ileon, en donde se observó, en la mayoría de las ocasiones, distensión intestinal, la pared adelgazada casi transparente y con frecuencia a nivel de la mucosa pequeñas hemorragias; por medio de una lupa de aumento siempre se encontró atrofia de las vellosidades. En el intestino grueso no se observaron cambios patológicos (CUADRO 4).

Por lo que toca a las lesiones microscópicas observadas en cortes histológicos de intestino delgado se encontró una severa atrofia de las vellosidades con necrosis de las células epiteliales, congestión de la mucosa y de la lámina propia, frecuentemente se observaron hemorragias y edema en la submucosa y exudado inflamatorio en la luz intestinal (CUADRO 4).

Con respecto a los resultados de la prueba de la enzima lactasa, ésta se efectuó en 20 lechones inoculados con el virus GTC y se encontró en 18 de ellos una nula actividad de la enzima, mientras que en los otros 2 lechones se observó un 80% de reducción en la actividad. En todos los lechones controles se encontró una actividad normal de la enzima que correspondió al 100% (FIGURA 3).

En relación a los resultados de la purificación de inmunoglobulinas de cerdo anti-GTC para efectuar los estudios de Inmunofluorescencia, se determinó por electroforesis en celogel que en el suero completo se obtuvieron las fracciones correspondientes a la albúmina, alfa-globulinas, beta-globulinas y gammaglobulinas. En el precipitado con sulfato de

amiento se encontraron fracciones que corresponden a pequeñas cantidades de albúmina y de alfa y beta-globulinas, la fracción de las gammaglobulinas se encontró enriquecida. A partir del precipitado y por medio de DEAE-celulosa, se obtuvo la fracción I eluida con buffer de fosfatos 0.02 M., pH 6.8 y que correspondió a la fracción enriquecida de IgG. La fracción II correspondió al resto de las proteínas del precipitado (FIGURA 4) (FIGURA 5a, 5b, 5c).

Por medio de inmunoelectroforesis se determinó que la fracción I tuvo dos líneas de precipitación, una de movilidad gamma, heterogénea y que probablemente corresponde a IgG y otra pequeña de movilidad lenta (FIGURA 6a). En la fracción II se determinaron varias bandas de precipitación pero no se observó la de IgG (FIGURA 6b).

El conjugado fluorescente fué elaborado con la fracción I, obteniéndose una relación molar de proteína-isotiocianato de fluoresceína de 1. El conjugado dió un título de 1 : 32 en cortes por criostato de intestino infectado y en células ST infectadas.

En los resultados obtenidos en los métodos de procesamiento de segmentos intestinales para el diagnóstico de GTC por el método de inmunofluorescencia se encontró lo siguiente :

a) Utilizando la congelación de los segmentos intestinales a una temperatura de -70°C y posteriormente efectuando cortes por medio del criostato a la temperatura de -30°C , se observó pérdida de la arquitectura intestinal y destrucción de las vellosidades. La inmunofluorescencia fué de difícil localización.

b) Por medio del congelamiento inmediato de segmentos intestinales con nitrógeno líquido y efectuando cortes longitudinales en el criostato a una temperatura de -30°C se observó bien la arquitectura intestinal, con células con fluorescencia específica alrededor de las vellosidades. En los estadios finales de la enfermedad la inmunofluorescencia desaparecía al no observarse las células epiteliales de las vellosidades intestinales.

c) Incluyendo los segmentos intestinales en parafina y efectuando el corte a temperatura ambiente por medio del microtomo, se observó perfectamente la arquitectura del intestino pero la fluorescencia específica desapareció.

d) Realizando improntas del intestino delgado se observó un acúmulo de células fluorescentes sin que se pueda precisar su origen o localización histológica.

Por lo que toca a los resultados obtenidos con el microscopio electrónico, se observó el virus de la GTC madurando en vesículas intracitoplasmáticas o libre en el citoplasma. Cuando estaba intracelular se observaba con la morfología típica de los virus Corona. Una vez afuera, el virus se encontraba aglutinado sobre la superficie de las microvellosidades de las células epiteliales de las vellosidades intestinales; en éstos casos no se pudo apreciar la morfología del virus Corona. (Figuras 7, 8 y 9).

Con respecto al diagnóstico diferencial de GTC y Colibacilosis, de los 4 lechones inoculados con Escherichia coli, se encontró que los signos clínicos consistieron en diarrea profusa a las 24 horas después de la inoculación de la cual persistió durante todo el transcurso de la enfermedad, erizamiento del pelo, deshidratación, decaimiento, no hubo ganancia de peso durante el transcurso de la enfermedad y una temperatura rectal promedio de 36.4°C

a partir de las 24 horas después de la inoculación y que se mantuvo así durante el curso de la enfermedad. En la prueba de la actividad de la enzima lactasa, se observó en dos lecciones una nula actividad de la enzima, mientras que en los otros dos se encontró una actividad normal. Por lo que toca a las lesiones encontradas a la necropsia, se observó en todos los casos dilatación e hiperemia del intestino delgado, edema a nivel de mesentario, y empleando una lupa de aumento, en 3 de los 4 casos, se observó atrofia de las vellosidades intestinales a nivel de yeyuno; en 3 de los 4 casos se halló dilatación del intestino grueso. En los cortes histológicos, a nivel de yeyuno se encontró una enteritis de tipo hemorrágico, congestión de la lámina propia, presencia de edema en la luz intestinal y células degeneradas en el epitelio intestinal. En cortes por medio del criostato de segmentos de yeyuno y teñidos posteriormente con el conjugado específico contra GTC, no se observó fluorescencia en ninguno de los casos.

CUADRO 1

AISLAMIENTO DEL VIRUS DE LA GTC EN LECHONES DE UN DIA DE EDAD
PROVENIENTES DE UNA GRANJA LIBRE DE GTC

LECHON No. (*)	DÍAS POSTINOCULACION			
	0	1	2	3
1	-	V-D	V-D	V-D-S
2	-	V-D	V-D	V-D-S
3	-	V-D	V-D	D-S
4	-	V-D	V-D	D-S
5	-	V-D	V-D	D-S
6	-	V-D	V-D	V-D-S
7	-	V-D	V-D	D-S
CONTROL	-	-	-	-
CONTROL	-	-	-	-

(*) Los lechones fueron inoculados con 1 ml. de una suspensión al 10 % del intestino delgado de lechones con cuadro diarréico.

- = No presentan signos clínicos.

V = Vómito.

D = Diarrea.

S = Sacrificado moribundo.

CUADRO 2

AISLAMIENTO DEL VIRUS DE LA GTC EN LECHONES DE UN DIA DE EDAD
PROVENIENTES DE CERDAS INMUNES (*)

LECHON No. (**)	DIAS POSTINOCULACION			
	0	1	2	3
1	-	V-D	V-D	D-S
2	-	V-D	V-D	V-D-S
3	-	V-D	V-D	V-D-S
4	-	V-D	V-D	V-D-S
5	-	V-D	V-D	D-S
6	-	V-D	V-D	D-S
7	-	V-D	V-D	D-S
CONTROL	-	-	V-D	-
CONTROL	-	-	-	-

(*) Se Inocularon 53 lechones pero en el cuadro se presentan los resultados de una camada y que son representativos del resto.

(**) Los lechones fueron inoculados con 1 ml. de una suspensión al 10 % del intestino delgado de lechones con cuadro diarreico.

- = No presentan signos clínicos.

V = Vómito.

D = Diarrea.

S = Sacrificado moribundo.

CUADRO 3

SIGNOS CLINICOS DE 60 LECHONES INOCULADOS CON
EL VIRUS GTC (*)

- a) Diarrea.
- b) Vómito.
- c) Deshidratación.
- d) Erizamiento del pelo.
- e) Decaimiento.
- f) Mortalidad.

(*) Los lechones fueron inoculados con una suspensión al 10 % de intestino delgado de lechones infectados con el virus GTC.

CUADRO 4

LESIONES MACROSCOPICAS Y MICROSCOPICAS DEL INTESTINO
DELGADO DE LECHONES INOCULADOS CON VIRUS GTC

MACROSCOPICAS :

Pared distendida y adelgazada.

Inflamación.

Pequeñas hemorragias en la mucosa intestinal.

Congestión en la mucosa.

Acumulación de líquidos y gas en la luz intestinal.

Ausencia de vellosidades.

MICROSCOPICAS :

Severa atrofia de las vellosidades.

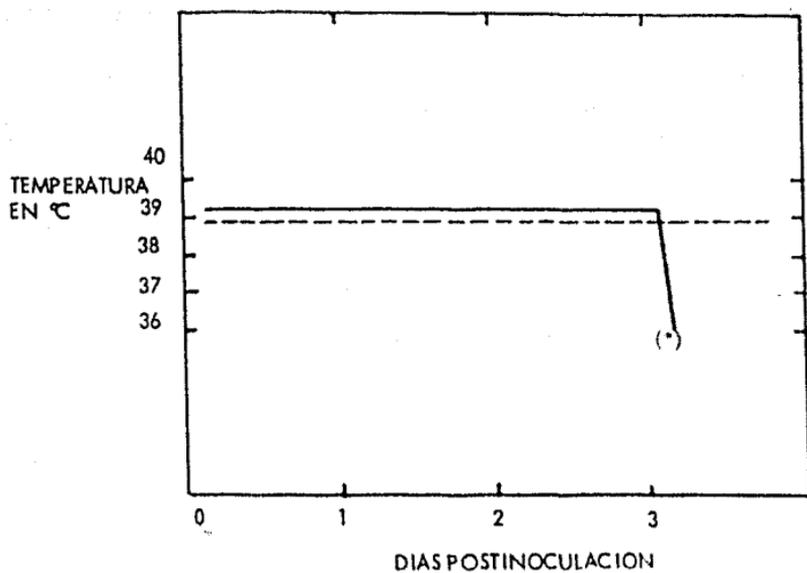
Congestión y edema de la mucosa y de la lámina propia.

Necrosis de las células epiteliales de las vellosidades.

Presencia de exudado en la luz intestinal.

FIGURA 1

MEDIA DE LA TEMPERATURA CORPORAL DE 14 LECHONES INOCULADOS
AL DIA DE EDAD CON EL VIRUS DE LA GTC



(*) Sacrificados.

— = Inoculados, 14 animales.

- - - = Controles, 4 animales.

FIGURA 2

PESO PROMEDIO DE 10 LECHONES INOCULADOS CON VIRUS DE LA GTC

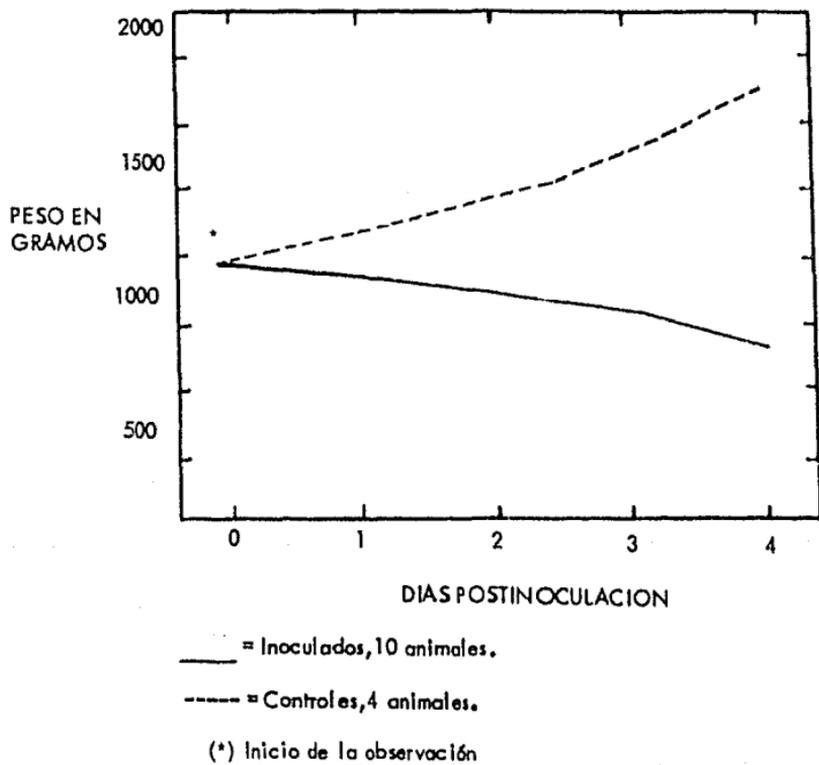
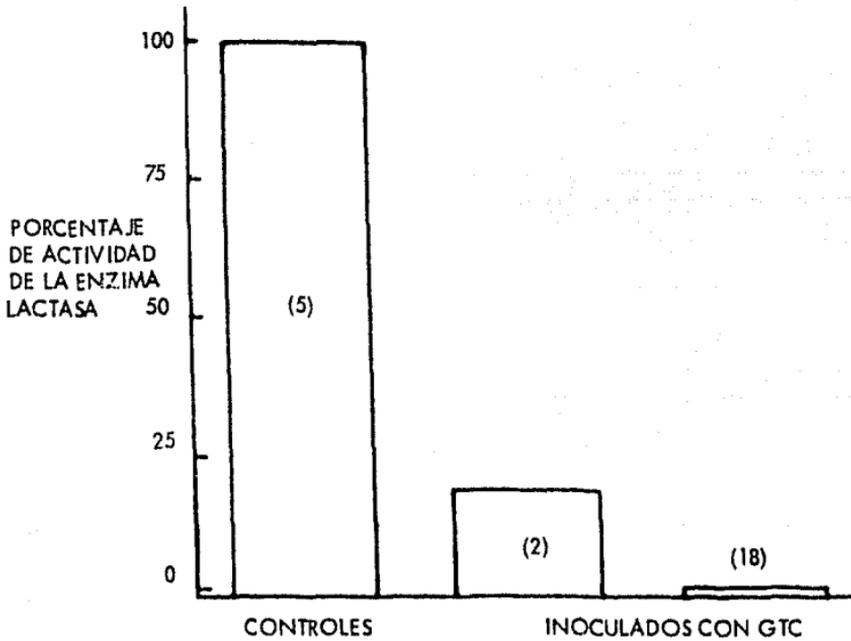


FIGURA 3

RESULTADOS DE LA PRUEBA DE LA LACTASA EFECTUADA A SEGMENTOS DE
INTESTINO DELGADO EN LECHONES INOCULADOS CON EL VIRUS GTC (*)



(*) De cada intestino delgado se probaron 3 segmentos.

() = Número de lechones.

FIGURA 4

RESULTADOS DE LA CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO (DEAE-CELULOSA) EFECTUADO AL PRECIPITADO DE SULFATO DE AMONIO 50 %, DE UN SUERO DE CERDO ANTI-VIRUS DE LA GASTROENTERITIS TRANSMISIBLE DE LOS CERDOS.

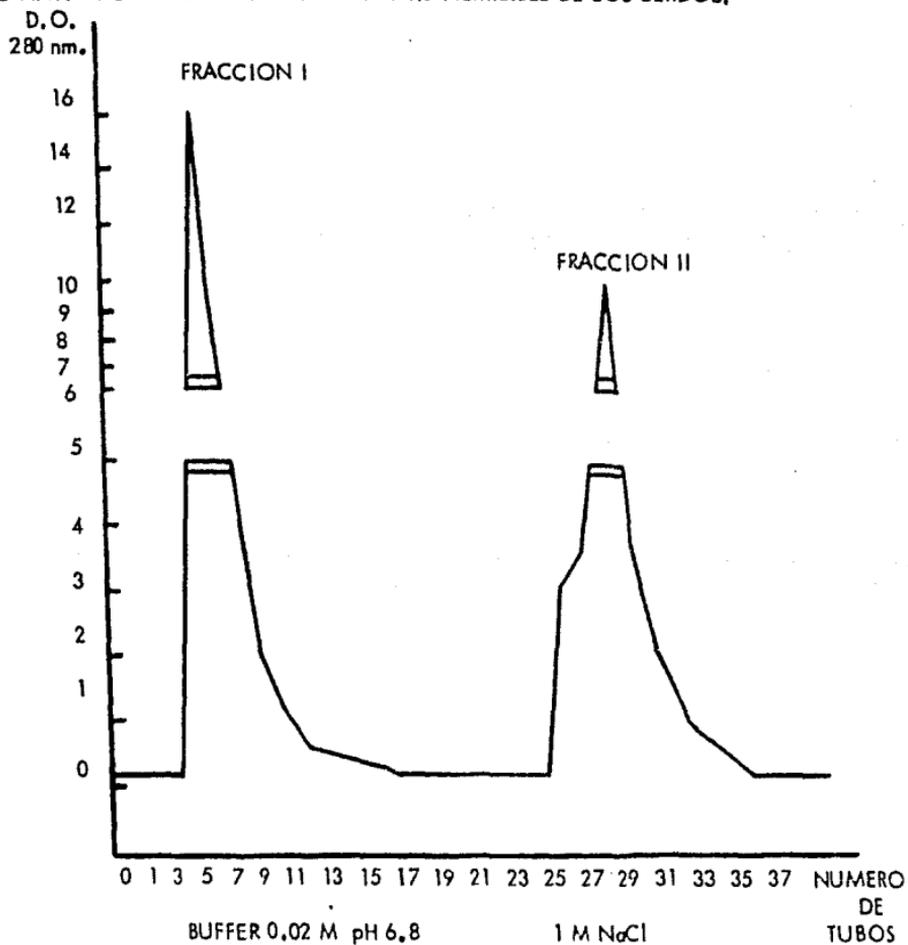


FIGURA 5

PATRONES OBTENIDOS EN ELECTROFORESIS EN CELOGEL DE UN SUERO DE CERDO HIPERINMUNIZADO CON VIRUS DE LA GTC, LA FRACCION PRECIPITADA CON SULFATO DE AMONIO AL 50 % Y LA FRACCION I OBTENIDA CON DEAE-CELULOSA.

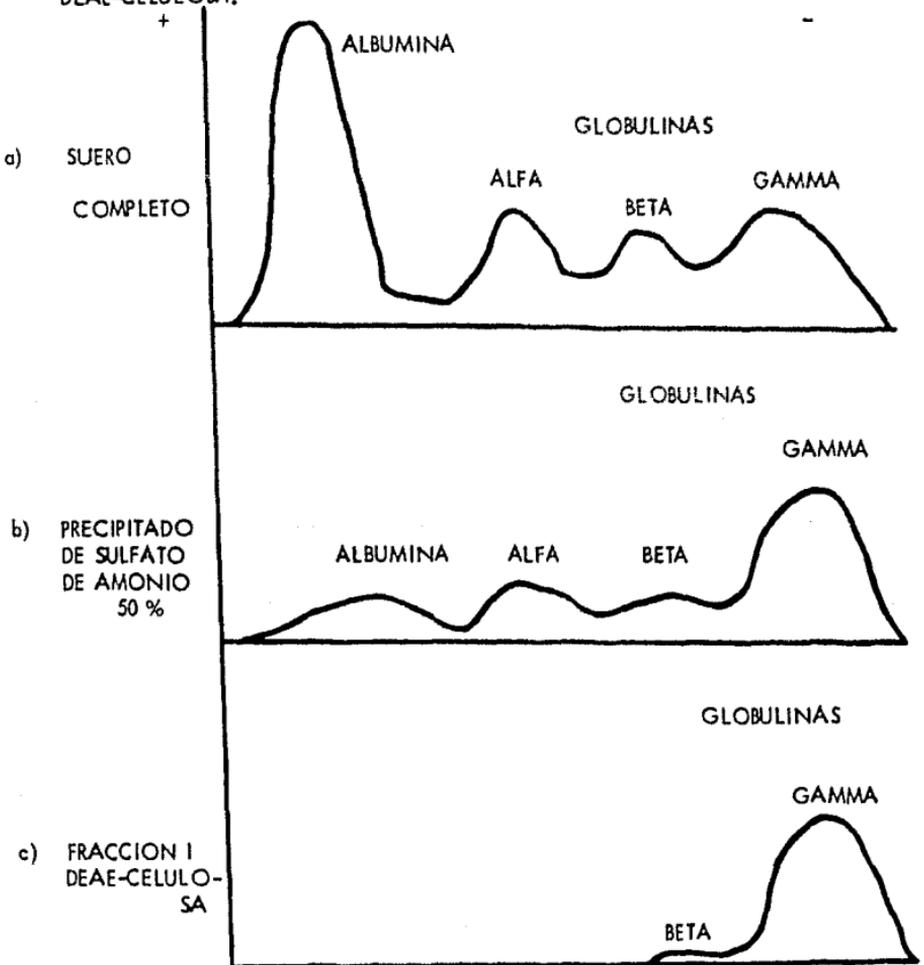


FIGURA 6

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE INMUNOELECTROFESIS EFECTUADAS A UN
SUERO DE CERDO HIPERINMUNIZADO CON VIRUS DE GTC Y A LAS FRACCIONES
I Y II OBTENIDAS POR DEAE-CELULOSA.

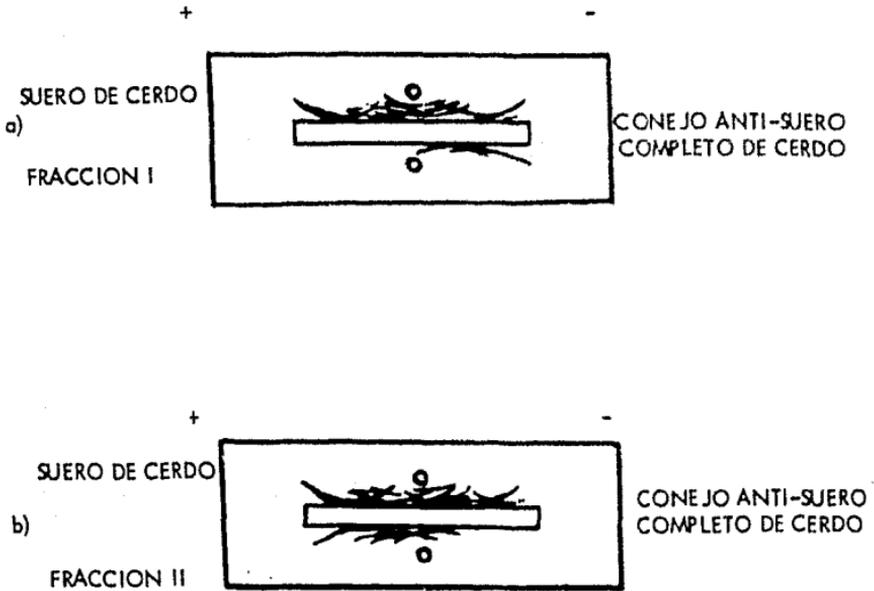
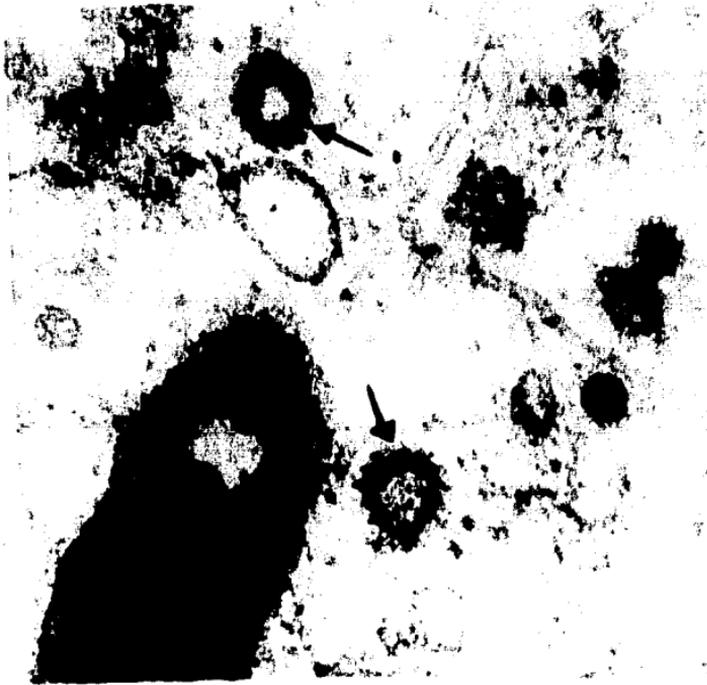


FIGURA 7

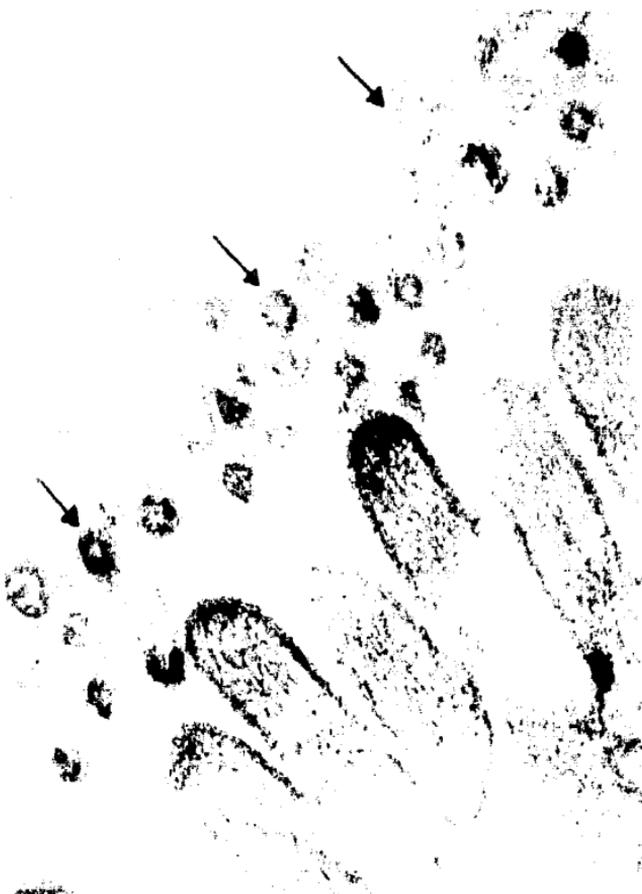
MICROFOTOGRAFIA ELECTRONICA DEL VIRUS GTC EN EL CITOPLASMA
DE UNA CELULA EPITELIAL



se observan las partículas características del virus GTC. Las partículas virales
tienen un diámetro de 100-120 mμ y un espesor de 10-15 mμ.

FIGURA 8

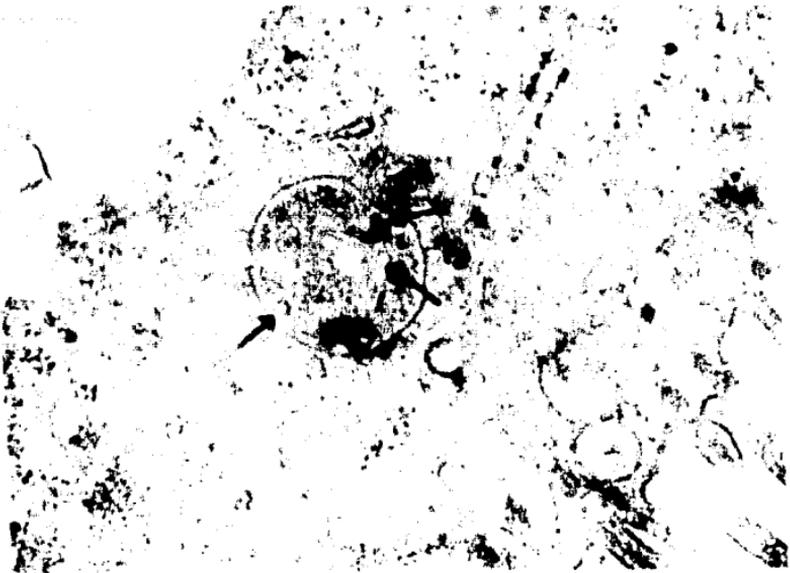
MICROFOTOGRAFIA ELECTRONICA DEL VIRUS GTC EN EL EXTERIOR DE LAS MICROVELLOSIDADES INTESTINALES.



20,000x

FIGURA 9

MICROFOTOGRAFIA ELECTRONICA DEL VIRUS GTC EN PROCESO DE FORMACION DENTRO DE UNA VACUOLA CITOPLASMICA



60,000 aumentos.

V. Discusión

El diagnóstico de la Gastroenteritis Transmisible de los cerdos (GTC) plantea una serie de dificultades al confundirse con otras entidades patológicas (Cross y Bohl, 1969). En México, al encontrarse bastante difundida la enfermedad, es de suma importancia realizar el diagnóstico certero. Esto es debido a que el control de la GTC se realiza por medio de la inmunización de las cerdas gestantes con la administración de virus vivo por vía oral, para proteger posteriormente a las camadas de lechones por medio de la inmunidad pasiva que proporciona el colostro (Haelterman, 1965). Al no diagnosticar correctamente la enfermedad, se diseminaría el virus en la granja lo que provocaría brotes explosivos de GTC. Además, es importante el diagnóstico temprano de la entidad al ocurrir los primeros casos clínicos, y de ésta manera poder controlar el brote de GTC y evitar su diseminación en el resto de las camadas por medio de medidas higiénicas o la utilización de virus de GTC administrado a las cerdas gestantes 3 semanas antes del parto (Morales, 1979). En el caso de que la entidad diagnosticada no haya sido GTC, se pueden tomar las medidas adecuadas para el control y tratamiento de la enfermedad, de ahí, la importancia de un diagnóstico exacto y rápido.

Diversas técnicas han sido recomendadas en el diagnóstico de la GTC. Bohl (1975) sugiere el aislamiento del virus en lechones como un buen método en el diagnóstico de la enfermedad. Los resultados obtenidos indican que éste es un buen método, además, se encontró que en el aislamiento del virus pueden utilizarse indistintamente lechones que provengan de granjas libres de GTC, como lechones de madres inmunizadas contra la en-

fermedad; en éste último caso se debe esperar un mínimo de 12 horas para la inoculación del virus para dar tiempo a que la IgA secretoria proveniente del colostro de la cerda sufra su destrucción para que no exista inactivación del virus (Morilla, comunicación personal). Por otra parte, éste método es útil para diferenciar la GTC de cualquier otra enfermedad de origen bacteriano, debido a que la suspensión viral se centrifuga a una alta velocidad y el sobrenadante, como se demostró, está libre de bacterias. Desafortunadamente es posible que haya confusión con otras enfermedades de origen viral, por ejemplo con diarreas causadas por Rotavirus (Torres, 1978).

Respecto a los signos clínicos de la GTC, éstos pueden ser fácilmente confundidos con los que se presentan en otras enfermedades, siendo la más frecuente la Colibacilosis de tipo entérica (Bohl y Cross, 1971). Esto se pudo observar ya que los lechones que fueron inoculados con virus GTC y lechones inoculados con Escherichia coli enteropatogénica, presentaron un cuadro clínico muy similar; sin embargo, se encontraron algunas diferencias tales como las temperaturas, que en los lechones inoculados con GTC siempre se conservaron dentro de los rangos de normalidad, mientras que en los lechones inoculados con E. coli se observó una hipotermia durante todo el curso de la enfermedad, probablemente debida a toxinas que afectan a nivel de hipotálamo (Dunne, 1975). Además, la pérdida de peso fue mayor en los lechones inoculados con GTC que en los de E. coli, debido probablemente a una menor absorción de nutrientes a nivel intestinal al existir una mayor atrofia de las vellosidades intestinales en los lechones con GTC. De acuerdo con los resultados, la

observación de los signos clínicos pueden ser sugerentes de GTC pero no es posible hacer un diagnóstico certero.

Con relación a las lesiones encontradas a la necropsia a nivel de tracto gastrointestinal, de los lechones inoculados con GTC, éstas correspondieron a las lesiones que se han reportado como características de la enfermedad (Woode, 1969). Estas fueron la presencia de líquido y gas en la luz intestinal, la pared distendida y adelgazada, aunque en ocasiones se encontraba la pared intestinal colapsa, hemorrágica y engrosada, ya que lechones inoculados con E. coli, en ocasiones, se encontraron con las mismas lesiones y además se hallaron cambios patológicos únicamente a nivel de intestino delgado (Kenworthy y Allen, 1966). Durante el desarrollo del trabajo se encontró que la utilización de una lupa para determinar la ausencia de vellosidades fue un buen método, siempre y cuando se incluyera un segmento de intestino de un animal sano para poder compararlo, lo cual resulta costoso. Con éste método en 3 lechones inoculados con E. coli también se observó esa ausencia de vellosidades por lo que puede haber confusión en el diagnóstico.

Por lo que toca a los cortes histológicos del intestino delgado de lechones inoculados con GTC, generalmente se observó una marcada atrofia de las vellosidades intestinales, debido al crecimiento del virus en la células epiteliales, lo que produce la necrosis y descamación de las mismas (Trapp y col., 1966). Otros cambios que se observaron con frecuencia fueron congestión y edema de la mucosa y submucosa, y presencia de exudado en la luz intestinal. En 3 lechones de los 4 inoculados con E. coli también se encontró atrofia

de las vellosidades a nivel de yeyuno, así como congestión y presencia de edema y exudado inflamatorio. Estos resultados indican que puede existir confusión al realizar el diagnóstico de la GTC por medio de técnicas histopatológicas (Bohl y Cross, 1971).

Con relación a la prueba bioquímica de la enzima lactasa se observó que en la mayor parte de los lechones con GTC la actividad de la enzima es nula, sin embargo, en 2 de 4 lechones inoculados con E. coli también se encontró una total reducción de esa actividad. Estos resultados van de acuerdo con Giles y col. (1977), quienes encontraron que en el 97% de los lechones con GTC se observaba una total reducción de la actividad de la enzima, pero también encontraron esa reducción en el 61% de lechones con otras enfermedades entéricas que producen pérdidas de la función de las células epiteliales de las vellosidades intestinales, las cuales son las productoras de la enzima lactosa. Por lo tanto, los resultados indican que la prueba es sugerente de un diagnóstico de GTC, pero no es específica, aunque puede ser de utilidad como prueba de apoyo a otras técnicas.

Respecto a la elaboración del conjugado específico para GTC, se decidió no utilizar la fracción precipitada con sulfato de amonio debido a que existen restos de albúmina, alfa y beta globulinas (FIGURA 5b), las cuales pueden reaccionar con los tejidos y dar fluorescencia inespecífica. Es por éste motivo que se empleó la fracción I de la elución en la columna de DEAE-celulosa, por ser la fracción enriquecida en IgG (FIGURA 6a) y que presentaba la inmunofluorescencia más específica al reaccionar con las células infectadas con el virus, como fue reportado por Torres (1976). En el conjugado fluorescente se obtuvo una relación molar de proteína-isotiocianato de fluoresceína de 1, en relación molares de 0.75 a 2 la fluorescencia inespecífica se elimina, o bien es muy poca; valores

menores de 0.75 producen una fluorescencia muy débil, y valores mayores de 2 provocan fluorescencia inespecífica (Peters y Coons, 1976). Además, para absorber proteínas que pudieran reaccionar inespecíficamente con los tejidos, se utilizaron polvos de hígado e intestino de cerdo normal y se encontró que utilizando el polvo de intestino se eliminaba más la fluorescencia inespecífica que utilizando polvo de hígado, esto es probablemente debido a la homología con el tejido empleado en el diagnóstico.

Diversos autores han reportado el uso de técnicas inmunofluorescentes para el diagnóstico rápido y efectivo de la GTC (Konishi y Bankowski, 1967; Pensæert y col., 1968; Solórzano y col., 1978) y que constituye el método de elección para el diagnóstico específico de la enfermedad. Para el empleo de éstas técnicas inmunofluorescentes es de suma importancia el correcto procesamiento del tejido intestinal, debido a que la fluorescencia únicamente se observa en las células epiteliales de las vellosidades infectadas con el virus. Empleando la congelación del intestino a una temperatura de -70°C y cortando posteriormente los segmentos por medio del criostato, se concluyó que el método no es bueno debido a que la congelación lenta a -70°C provoca la formación de cristales de hielo que destruyen a las células epiteliales de las vellosidades, dificultando la observación de la fluorescencia (Herreveld y col., 1976). Por medio del congelamiento inmediato del tejido con nitrógeno líquido, protegido con Tissue Tek y corte posterior por medio del criostato, se encontró que poca destrucción celular, con ésta técnica se observaron a las células con fluorescencia específica alrededor de las vellosidades; éste método resultó bastante bueno para el diagnóstico, encontrando positivos a GTC alrededor del 90% de los lechones que previamente habían sido inoculados con el virus. Utilizando la técnica de inclusión de los segmentos intestinales en

parafina no se observó fluorescencia, probablemente debido a efectos de la temperatura que se necesita en las técnicas histológicas rutinarias, o bien por la utilización de disolventes de los lípidos que podrían alterar la antigenicidad del virus. Por otra parte, al realizar improntas de la mucosa del intestino delgado se encontraron células fluorescentes semejantes a lo que reportan Black (1971) y Garza (1976) en cerdos recuperados de la infección. Reyes (1976) utilizó una técnica semejante tiñendo a las células con un conjugado contra GTC, pero también demostró que es posible utilizar un conjugado contra el virus de la Bronquitis Infecciosa de las aves (BI); ésto es factible ya que Romano (1975) encontró que el virus de GTC y BI tienen antígenos comunes. Por otra parte, los resultados obtenidos indicaron que el método de las improntas es rápida y fácil de efectuar pero da resultados variables y en ocasiones de difícil interpretación.

Por último, el método de la microscopía electrónica permitió observar fácilmente al virus intracelular y sobre la superficie de las células, lo que proporciona un diagnóstico más seguro de que la causa de la enfermedad es GTC, aunque podría confundirse con Rotavirus, sobretodo cuando se encuentra libre sobre la superficie de la célula y cubierta con aglutininas, como se observó con el virus de la GTC. Los resultados indican que el método puede proporcionar un diagnóstico más seguro, pero es tardado, costoso y se requiere de laboratorios y personal altamente capacitado (Wagner y col., 1972).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron que el diagnóstico de la GTC es difícil de efectuar, siendo recomendable la utilización de varios métodos. Por medio del aislamiento del virus en lechones es posible llegar a un diagnóstico, aunque constituye un

método caro debido al costo de los animales. El diagnóstico más preciso de la enfermedad se puede realizar por medio de técnicas inmunofluorescentes, lo cual resulta barato y fácil, o bien empleando el microscopio electrónico, el cual plantea los inconvenientes de la tecnología que se necesita, así como el costo que puede resultar excesivo.

VI. Conclusiones

- 1) Para efectuar el diagnóstico de GTC deben utilizarse la combinación de varios métodos.
- 2) Por medio de la observación de signos clínicos, temperatura rectal, peso corporal, lesiones macroscópicas y microscópicas y prueba de la lactasa no se puede llegar a un diagnóstico definitivo de GTC.
- 3) Por medio del aislamiento del virus en lechones susceptibles, es posible diferenciar la GTC de cualquier otra enfermedad de origen bacteriano. Además se encontró que es posible utilizar lechones de hembras inmunes.
- 4) Las pruebas de inmunofluorescencia y microscopía electrónica son las más confiables para el diagnóstico, siendo la inmunofluorescencia la más económica y fácil de efectuar.
- 5) La Colibacilosis de tipo entérica es una enfermedad que se puede confundir fácilmente con la GTC.

VII. Resumen

La Gastroenteritis Transmisible de los cerdos (GTC) es una enfermedad vírica, sumamente contagiosa, que es caracterizada por diarrea, vómito, deshidratación y elevada mortalidad en lechones menores de dos semanas de edad. En el campo existen varias enfermedades de los lechones que son fácilmente confundibles con GTC, especialmente la Colibacilosis entérica. En el presente trabajo se evalúan algunos de los métodos empleados para llegar al diagnóstico definitivo de la enfermedad.

Camadas de lechones de un día de edad fueron inoculadas con una cepa de virus GTC (cepa Texcoco). Los métodos empleados para identificar GTC en éstos lechones fueron: Aislamiento del virus en cerdos de 1 a 3 días de edad, signos clínicos de la enfermedad, lesiones a la necropsia, histopatología de segmentos intestinales, prueba bioquímica de la actividad de la enzima lactasa, inmunofluorescencia de cortes de intestino delgado y microscopía electrónica de cortes ultrafinos de porciones del yeyuno.

Los resultados indicaron que el aislamiento del virus a partir del intestino de lechones con cuadro diarréico, en lechones provenientes de cerdas susceptibles o inmunes, es un buen método para el diagnóstico de GTC y además permite diferenciar la enfermedad de otras de otras entidades de origen bacteriano. Se observó que la sintomatología de la enfermedad puede ser confundida con algunas otras entidades, así como las lesiones macroscópicas y microscópicas y la actividad de la enzima lactasa. La inmunofluorescencia en cortes de intestino delgado y en improntas intestinales es específica siendo un buen método para llegar al diagnóstico. Al microscopio electrónico puede observarse con relativa facilidad el virus, por lo que puede ser un buen método de diagnóstico, pero es caro y tardado. Al inocularse 4 lechones con *Escherichia coli* y comparar los diversos métodos de diagnóstico para la GTC, se

observó que la enfermedad provocada por E. coli enteropatógena se confunde fácilmente con GTC.

VIII. Referencias

- Bay, W.W., Doyle, L.P., and Hutchings, L.M., 1951, The pathology and symptomatology of transmissible gastroenteritis. *Am. J. Vet. Res.*, 12:215-218.
- Black, J.W., 1971, Diagnosis of TGE by FA: Evaluation of accuracy on field specimens. *Proc. U.S. Animal Health Assoc.*, 75:492-497.
- Bohl, E.H., 1975, Transmissible Gastroenteritis: En, Diseases of Swine, Editado por H.W. Dunne, The Iowa State University Press, Ames Iowa. pp:168-188.
- Bohl, E.H., and Kumagai, T., 1965, The use of cell culture for the study of TGE virus of swine. *Proc. 69th Annual Meeting U. S. Livestock San. Asso.*, 69:343-350.
- Bohl, E.H., and Cross, R.F., 1971, Clinical and pathological differences in enteric infections in pigs caused by *Escherichia coli* and by transmissible gastroenteritis virus. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 176:150-162.
- Boletín Zoonosario, S.A.G., 1969 a 1976.
- Bradburne, A.E., and Tyrrel, D.A., 1971, Coronaviruses in man. *Prog. Med. Virol.*, 13:373-403.
- Cartwright, S.F., 1966, A cytopathic virus causing a transmissible gastroenteritis of swine. II. Biological and serological studies. *J. Comp. Pathol.*, 75:387-396.
- Coons, A.H., Leduc, E.H., and Kaplan, M.H., 1976, En, Methods in Immunology and Immunochemistry, Editado por C. A. Williams and M.W. Chase. Academic Press, U. S. A. U. K., 5:424-444.
- Cornelius, L.M., Hooper, B.E., and Haelterman, E. O., 1968, Changes in fluid and electrolyte balance in baby pigs with transmissible gastroenteritis. *Amer. J. Vet. Clin. Path.*, 2:105-113.
- Cross, R.F., and Bohl, E.H., 1969, Some criteria for the field diagnosis of porcine transmissible gastroenteritis. *J.A. V.M.Z.*, 154:266-272.
- Doyle, L.P., and Hutchings, L.M., 1946, A transmissible gastroenteritis in pigs. *J.A.V.M.A.* 108:257-265.

- Dunne, H.W., 1975, Colibacillosis and Edema Disease, En, Diseases of Swine, Editado por H.W. Dunne, The Iowa State University Press, Ames Iowa, pp:650-680.
- Feenstra, E.S., Thorp, F., Gray, M.L., and McMillen, W.N., 1948, Transmissible gastroenteritis of baby pigs. J.A.V.M.A., 113:573-575.
- Garza, C.A.R., 1973, Detección del virus de Gastroenteritis Transmissible por medio de anticuerpos fluorescentes en cerdos recuperados de la infección natural. Tesis de Licenciatura, Fac. Med. Vet. y Zoot., U.N.A.M.
- Giles, N., Borland, E.D., Counter, D.E., and Gibson, E.A., 1977, Transmissible gastroenteritis in pigs. Some observations on laboratory aids to diagnosis. Vet. Rec., 100:336-337.
- Goldman, M., 1968, Fluorescent Antibody Methods. Academic Press, New York and London., pp: 80-104.
- Goodwin, R.F.W., and Jennings, A.R., 1959, Infectious gastroenteritis of pigs. I. The disease in the field. J. Comp.Pathol., 69:87-97.
- Haelterman, E.O., 1972, On the pathogenesis of transmissible gastroenteritis of swine. J.A.V.M.A., 160:534-540.
- Haelterman, E.O., 1965, Lactogenic immunity to transmissible gastroenteritis of swine. J.A.V.M.A., 147:1661-1668.
- Haelterman, E.O., and Pensaert, M.G., 1967, Proc. 18th World Vet. Congr. 2:569-572.
- Harada, K., Furuuchi, S., Kumagai, T., and Sasahara, J., 1969, Pathogenicity, Immunogenicity, and distribution of transmissible gastroenteritis virus in pigs. Nat. Inst. Animal Health Tokyo Quart., 9:185-192.
- Herveveld, A.V., Crowell, J., and Malhotra, S.K., 1976, Freezing and Dehydration, En, Methods in Immunology and Immunochemistry, Editado por C.A. Williams and M.W. Chase, Academic Press, U.S.A., U.K., 5:379-381.
- Hooper, B.E., and Haelterman, E.O., 1966, Concepts of pathogenesis and passive immunity in transmissible gastroenteritis of swine. J.A.V.M.A., 149:1580-1586.
- Hooper, B.E., and Haelterman, E.O., 1969, Lesions of the gastrointestinal tract of pigs infected with transmissible gastroenteritis. Can. J.Comp. Med. and Vet. Sci., 33:29-36.

- Hudson, L., and Hay, F.C., 1976, Practical Immunology. Oxford. Blackwell Scientific Publications., pp:93-108.
- Kawamura, A., 1976, Fluorescent antibody techniques and their applications, En, Methods in immunology and immunochemistry, Editado por C.A. Williams and MW. Chase, Academic Press, U.S.A., U. K., 5:424-444.
- Kenworthy, R., and Allen, W.D., 1966, The significance of Escherichia coli to the young pig. Jour. Comp. Path., 76:31-43.
- Konishi, S., and Bankowski, R.A., 1967, Use of fluorescein labeled antibody for rapid diagnosis of transmissible gastroenteritis in experimentally infected pigs. Am. J. Vet. Res., 125:937-942.
- Lee, K.M., Moro, M., and Baker, J., 1954, Transmissible gastroenteritis in pigs. Am. J. Vet. Res., 15:364-372.
- Morales, M.E., 1979, Experiencias con el uso de un Inmunógeno elaborado a partir de virus vivo para el control de la Gastroenteritis Transmisible de los cerdos en una granja de producción extensiva. Tesis de licenciatura. Fac. Med. Vet. y Zoot., U.N.A.M.
- Nunn, R.E., 1970, Electron microscopy: Microtomy, staining and specialized techniques, En, Laboratory aid series, Editado por F. J. Baker. Butterworths, London., pp:27-48.
- Okaniwa, A., Ishitani, R., Sasahara, J., Watanabe, M., 1959, Studies on TGE in Japan. II. Pathological observations on naturally and experimentally infected cases. Nat. Inst. Animal Health Tokyo Quart., 37:9-18.
- Okaniwa, A., and Maeda, M., 1966, Histopathology of transmissible gastroenteritis in experimentally infected newborn piglets. II. Lesions in organs other than the digestive tract and pathologic features of TGE. Nat. Inst. Animal Health Tokyo Quart., 6: 24-32.
- Okaniwa, A., Maeda, M., Harada, K., and Kaji, T., 1966, Electron microscopy of swine transmissible gastroenteritis (TGE) virus in tissue culture cells. Nat. Inst. Animal Health Tokyo Quart., 6: 119-120.
- Olguín, R.F., 1970, Aislamiento del virus de Gastroenteritis Transmisible de los cerdos. Vet. Rev. F.M.V.Z., 2: 11-16.

- Pensaert, M. B., Hoeltermann, E. O., and Burnstein, T., 1968, Diagnosis of transmissible gastroenteritis in pigs by means of immunofluorescence. *Can. J. Comp. Med. and Vet. Sci.*, 32:555-561.
- Peters, J. H., and Coons, A. H., 1976, Fluorescent antibody as specific cytochemical reagents, En, *Methods in Immunology and Immunochemistry*, Editado por C. A. Williams and M. W. Chase. Academic Press, U. S. A., U. K., 5:424-444.
- Pospisil, Z., Mesáros, E., and Stepanek, J., 1969, Immunofluorescent detection of transmissible gastroenteritis virus in the intestines of piglets. *Zentr. Veterinarmed. B.*, 16:840-845.
- Reber, E. F., 1955, Airborne transmissible gastroenteritis. *Am. J. Vet. Res.*, 17: 194-195.
- Reyes, J. J., 1976, Resultados de la utilización de un conjugado fluorescente contra bronquitis infecciosa de las aves frente al virus de Gastroenteritis Transmisible de los cerdos. Tesis de licenciatura. Fac. Med. Vet. y Zoot., U. N. A. M.
- Romano, J. J., 1974, Relaciones antigénicas del virus de bronquitis infecciosa de las aves con el virus de Gastroenteritis Transmisible de los cerdos. Tesis de licenciatura. Fac. Med. Vet. y Zoot., U. N. A. M.
- Solórzano, R. F., Morin, M., and Morehouse, L. G., 1978, The use of immunofluorescence techniques for the laboratory diagnosis of transmissible gastroenteritis of swine. *Can. J. Comp. Med.*, 42:385-391.
- Torres, J. L., 1976, Purificación del virus de la gastroenteritis transmisible del cerdo por cromatografía de columna y su utilización para preparar un conjugado fluorescente específico. Tesis de licenciatura. Fac. Med. Vet. y Zoot., U. N. A. M.
- Torres, M. A., 1978, Porcine Rotavirus, Proc. Nineteenth Annual George A. Young Conference and 18th Annual Nebraska SP6 Conference, Lincoln, Nebraska.
- Trapp, A. L., Sanger, V. L., and Stalnaker, E., 1966, Lesions of the small intestinal mucosa in transmissible gastroenteritis infected germ-free pigs. *Am. J. Vet. Res.*, 27: 1695-1702.
- Underdahl, N. R., 1978, Is it TGE or could it be Rotavirus? *Hog Management.*, 15:46-49.
- Waxler, G. L., 1972, Lesions of transmissible gastroenteritis in the pig as determined by scanning electron microscopy. *Am. J. Vet. Res.*, 33: 1323-1328.
- Wagner, J. E., Beamer, P. D., and Ristic, M., 1972, Electron microscopy of intestinal epithelial cells of piglets infected with a Transmissible Gastroenteritis virus. *Can. Jour. Com. Med.*, 37:177-188.

- Whitehair, C. K., Grummer, R. H., Phillips, P. H., Bohstedt, G., and McNutt, S. H., 1948, Gastroenteritis in pigs. *Cornell Vet.*, 38:23-29.
- Wood, B. T., Thompson, S. H., and Goldstein A., 1976, En, *Methods in Immunology and Immunochemistry*, Editado por C. A. Williams and M. W. Chase. Academic Press, U. S. A., U. K., 5: 424-444.
- Woode, G. M., 1969, Transmissible gastroenteritis of swine. *Vet. Bull.*, 39:239-246.
- Woods, N. G., 1978, Rotavirus the new baby scours. *Proc. Animal Industry Week*, Ames, Iowa.
- Young, G. A., Hinz, R. W., and Underdahl, N. R., 1955, Some characteristics of TGE in disease-free antibody-devoid pigs. *Am. J. Vet. Res.*, 16:533-539.
- Yusken, J. W., Ho, P., Reber, D. F., and Morton, H. W., 1959, The effect of infecting newborn pigs with TGE virus. *Am. J. Vet. Res.*, 20:585-588.