

APORTES AL ESTUDIO DE PARVOVIRUS PORCINO*

Alvaro A. Romero G. **
Luis Carlos Villamil J. **
José Darío Mogollón ***

RESUMEN

El parvovirus porcino se encuentra en aproximadamente el 90% de las explotaciones porcinas en Colombia. Su presencia en nuestro país se reporta desde la década de los 70s y al respecto se han hecho numerosos estudios serológicos lográndose el primer aislamiento en 1987 (González y Torres, 1987).

En el presente estudio se plantearon 4 experimentos:

A. Estudio serológico en animales adultos: se tomaron 148 muestras de sangre en tres frigoríficos de la ciudad de Santafé de Bogotá y en cinco granjas de los Departamentos de: Antioquia (2), Cundinamarca (2) y Valle (1).

Por la prueba de HI se obtuvieron títulos que oscilaron entre 1:20 y > 81920, con promedio geométrico (GMT) de 2518.1 para hembras y 798.8 para machos; Frigorífico Suizo: 20 muestras, títulos entre 1:160 - 1:10240, GMT de 735.2 para machos y 788 para hembras; Frigorífico San Martín, 53 sueros, títulos de 1:20 - > 81920, con GMT de 546 para machos y 4300 para hembras. Los porcentajes de positividad en el chequeo, fueron de 77.5%, 100% y 28.3% respectivamente. Al comparar los tres frigoríficos y hacer el análisis de varianza se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas ($p < 0.01$). En Granjas se tomaron 91 muestras de suero, los títulos oscilaron entre 1:160 a 1:40960, se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

B. La segunda parte de la investigación consistió en la recolec-

ción de 102 úteros preñados en los mataderos Central, Guadalupe y San Martín; en ellos se analizaron 979 fetos; además se adicionaron 20 fetos provenientes de Granjas; de estos, se tomaron 224 muestras de líquido torácico. A los fluidos de fetos menores de 65 días se les hizo hemaglutinación (HA), a los mayores de 65, se les corrió HI. La distribución porcentual de positividad fue: 7.45% para el Guadalupe, 17.8% para el Central, 43.8% para Granjas, y no positivos en el San Martín.

C. En el tercer experimento, se seleccionaron de cinco granjas al azar 77 cerditas de reemplazo, 28 en Antioquia, 34 en Cundinamarca y 15 en el Valle, repartidas en cinco granjas. Las dos del departamento de Antioquia metodológicamente se agruparon como una. A los animales seleccionados al azar, se les determinó catabolismo de anticuerpos maternos; se practicaron sangrías sucesivas cada tres semanas, empezando al momento del destete y culminando hacia la semana 23, en total se hicieron 6-7 tomas por animal. Los títulos oscilaron entre 1:10 a > 81920. El comportamiento de medias fue el siguiente: Antioquia 396.1, Cundinamarca 1355.5 y 235.8, Valle 2288.2. En el análisis de varianza y estudio de medias (SNK), las diferencias fueron altamente significativas ($p < 0.01$), entre los tres Departamentos.

D. El cuarto experimento consistió en montar un preliminar de estandarización de la prueba de inmunoperoxidasa, para diagnóstico de parvovirus porcino (PVP); se trabajaron cultivos celulares de la línea PK-15 de 24 horas de crecimiento e infectados con parvovirus porcino (PVP). Los re-

sultados obtenidos son promisorios para en el futuro estandarizarla como una prueba de uso rutinario.

INTRODUCCION

Dentro de las limitantes tecnológicas para el desarrollo de la Industria Porcina, los problemas reproductivos son de gran incidencia en la dinámica poblacional. Entre éstos, el parvovirus porcino (PVP) es uno de los más relevantes en Colombia. Encuestas serológicas realizadas en los Departamentos de Antioquia, Valle del Cauca y Cundinamarca, se han encontrado sero-reactores positivos que oscilan entre 36%, 51.7% y 42-66% respectivamente; en cuanto a ganjas la positividad está alrededor del 93%, lo que demuestra que la entidad está distribuida dentro de los diferentes núcleos poblacionales en el país (González y Torres 1986, Velasco 1991).

La información que se tiene en el país es fragmentaria, se desconocen coberturas vacunales, tipos de biológicos más usados, rutinas y en general todo lo concerniente a inmunización activa. En cuanto al virus de campo, la información no es muy amplia y se remite a estudios serológicos y a intentos de aislamiento, exitosos y fallidos (González y Torres, 1986, Silva y Suárez, 1989).

Con base en lo anterior y para tener datos complementarios se planteó la investigación en varios frentes como: serología en animales adultos de granjas y a nivel de plantas de sacrificio, catabolismo de anticuerpos maternos para conocer los rasgos de inmunidad pasiva; nuevas alternativas de diagnóstico a partir de

fluidos corporales para tener certeza sobre posibles causas de falla gestacional, lo mismo que técnicas de inmunodiagnóstico complementarias y de relativa facilidad en su realización.

REVISION DE LITERATURA

El virus de la parvovirus porcina está ampliamente diseminado en el mundo y se considera al cerdo como su único hospedero natural; fue aislado por primera vez en Surrey (Inglaterra) por Cartwright y Huck en 1967. En 1968, se clasificó como un DNA-virus y en 1970-73, se le dio el nombre de Parvoviridae a la familia a la que pertenece este agente; (parvum=pequeño) (Berns, 1990, Thacker, 1988).

El parvovirus igual que sus congéneres es un virus que tiene probablemente 32 capsómeras y 21-25 nm de diámetro. El genoma consiste de una cadena sencilla de DNA con un peso de $1.5-2 \times 10^6$; posee 3 polipéptidos VP1, aproximadamente el 10%, VP2 presente en forma apreciable en partículas vacías y completas y VP3 el más abundante. El virus se replica intracelularmente y el sitio de maduración es el núcleo, para ello requiere de células en proceso activo de división, especialmente en fases S o G2.

Todos los parvovirus porcinos tienen propiedades hemaglutinantes y se ha determinado que la temperatura a la cual se presenta una mayor aglutinación es a 4°C. De la misma manera presentan mayor grado de aglutinación con cierto tipo de eritrocitos como son los de cobayo, por tanto son los que se usan de rutina en el laboratorio para la prueba de HI. Debido a la estruc-

* Este artículo representa parte de la tesis de maestría del primer autor, desarrollado en el posgrado de Salud y Producción animal de la Universidad Nacional.

** Respectivamente, MV., MSc. y DMV., MSc., Ph.D., profesor Asistente y Asociado de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional.

*** DMV., MSc., Ph.D., investigador Corpoica Santafé de Bogotá.

tura simple de la partícula viral, la hemaglutinación es idéntica ya sea con cápsidas vacías, partículas incompletas, viriones completos o de diferentes densidades (Mengeling, 1990, Silva y Suárez, 1989).

La historia de los parvovirus porcinos está asociada a fallas reproductivas, desde las primeras observaciones hechas por Cartwright y Huck, cuando empezaron a estudiar la posible participación de este agente en disturbios gestacionales, hasta el presente, se ha reportado la presencia de sólo un tipo de PVP, aunque se han observado cepas de virulencia variable como la NADL-8 que se considera como la más agresiva. La infección por parvovirus se puede considerar enzoótica dentro de muchos de los planteles porcinos; la mayoría de los animales dedicados a la reproducción poseen algún grado de inmunidad activa adquirida por la exposición natural al virus de campo (Dial y Morrison, 1992; Morrison y Joo, 1985). El PVP se difunde en forma horizontal y se adquiere por vía oronasal primordialmente; aunque la vía genital puede tener alguna importancia en ciertas condiciones de campo. Las cerdas de reemplazo y las cerdas primerizas son el grupo más susceptible; sin embargo tienen algún grado de protección pasiva por medio de los anticuerpos maternos derivados del calostro proveniente de madres infectadas; Estos anticuerpos son de relativa larga duración y persisten por unas 16-21 semanas, luego los animales se hacen sus-

ceptibles a la infección de campo. Los anticuerpos maternos tienen importancia pues pueden interferir con los procesos de inmunización activa. Debido a la persistencia de los anticuerpos adquiridos por medio del calostro, las cerdas pueden no ser susceptibles sino hasta una época cercana al primer servicio o los estadíos tempranos de gestación (Donaldson-Wood y Joo, 1984, Hogg y Lenghaus, 1977, Pointon et. al., 1983).

Las instalaciones contaminadas y las cohortes en ellas presentes constituyen el mayor reservorio para la presentación de brotes de características epizooticas o para mantener la entidad en forma enzoótica. El virus de campo puede persistir dentro de los planteles por períodos de tiempo apreciables, dadas las propiedades físicoquímicas del agente (Johnson y Donaldson-Wood, 1986).

En los casos epidémicos, el primer signo observado a nivel de explotación es la reducción de la fertilidad; las cerdas que se infectan durante las dos primeras semanas de gestación pierden sus embriones y retornan al estro en períodos irregulares; al cabo de unas seis semanas de iniciado el brote se hace evidente la presencia de fetos momificados. En casos endémicos, se observa presencia esporádica de momias, hay tendencia a la reducción del número de lechones por camada, abortos esporádicos, seudopreñeces, camadas dispares y en algunos casos incremento mo-

derado en la mortalidad neonatal (Dial y Morrison, 1992; Mengeling, 1990; Wrathal, 1984).

Los índices de prevalencia serológica en animales, para diferentes sitios y países son muy altos, 67-88% para USA, 68% en Francia, 80-100% en Argentina, 100% en Eslovenia, 84% para Canadá, 90-95% en Inglaterra, 93% Australia, Colombia 45-85% (Dial y Morrison; Foll y Solignac, 1987; Morrison y Joo, 1985; Reynolds, 1984; Ramírez, 1991; Robinson, Cartwright y Danson, 1985).

La habilidad del PVP para cruzar la barrera placentaria en cerdas gestantes varía un poco de acuerdo a la cepa de campo y al estado inmunológico específico. La secuela de la infección transplacentaria depende en gran parte del tiempo de gestación y puede traducirse en muerte embrionaria con reabsorción si la infección es muy temprana; posteriormente se puede presentar muerte fetal con momificación; si la infección del feto es posterior a los 70 días de desarrollo, estos pueden controlar inmunológicamente el virus, aunque ocasionalmente se presentan pérdidas aún en fase de protección (Huysman, 1991; Walton, 1987).

MATERIALES Y METODOS

La metodología que se siguió dentro de los diferentes experimentos fue la siguiente:

- + = fetos ligeramente edematosos.
- + + = fetos francamente edematosos.
- + + + = fetos edematosos en proceso de momificación.
- + + + = fetos francamente momificados.

c. Catabolismo de anticuerpos maternos: Se tomaron al azar 77 cerdas de reemplazo en los departamentos de Antioquia 28, Cundinamarca 34, Valle 15. Estas cerdas estuvieron repartidas en cinco granjas, Antioquia 2, Cundinamarca 2, Valle 1. Se hicieron sangras periódicas cada 3 semanas, a partir de la fecha de destete que fue de aproximadamente 35 días (5 semanas); en total se hicieron siete tomas de sangre por cerda seleccionada y se concluyó el muestreo hacia las 23 semanas, época en que los animales entran en pleno al grupo dedicado a la reproducción. A los

sueros colectados se les hizo HI, se determinó GMT por cohortes, regresión, curva de declinación de títulos y análisis de varianza. El título se expresa como el inverso de la máxima dilución en la cual se presentó inhibición de la hemaglutinación.

d. En el cuarto experimento se hicieron los preliminares para la estandarización de la prueba de inmunoperoxidasa; para ello se trabajaron cultivos celulares de la línea PK-15, infectados con PVP porcino; los cuales se fijaron en acetona y luego se siguió un procedimiento general para este tipo

de prueba, con algunas variantes de acuerdo a las recomendaciones de varios autores.

La variante principal dentro de la metodología usual, fue la de adicionar albúmina al 0.5% al PBS empleado para los enjuagues, en la fase de fijación. La solución de revelado se preparó con 3-amino 9-etilcarbazole, así: se disolvieron 10 mgrs de 3-amino 9-etilcarbazole en 3 mls de N N-dimetil formamida, se adicionaron 25 mls de buffer acetato pH 5.0, de concentración 0.05M, al que se le habían adicionado 100 uls de peróxido de hidrógeno al 3%. Luego de la fi-

a. Estudio serológico de animales adultos: A nivel de planta de sacrificio se hizo un muestreo totalmente al azar tomando muestras al momento de eyugulado de los animales. A nivel de granjas, el muestreo fue también aleatorio y se tomó por venipunción de la yugular. El total de muestras recolectadas fue de 239, 148 en mataderos y 91 a nivel de granjas.

b. Recolección de úteros preñados a nivel de planta de sacrificio: se hizo en los frigoríficos Central, Guadalupe y San Martín; se colectaron 102 úteros gestantes; se hizo estudio y análisis de útero por útero y de absolutamente todos los fetos presentes en ellos, se determinó la edad de gestación mediante la fórmula: largo del feto x 3 + 21 = edad aproximada de gestación. De los fetos presentes, se tomaron muestras de líquidos torácicos, dos por cada útero, una por cada cuerno, se rotularon por sitio de procedencia y tiempo de gestación; además se procesaron 20 muestras adicionales de líquidos torácicos de fetos provenientes de granjas; en total se procesaron 224 muestras de fluidos torácicos. A las provenientes de fetos menores de 65 días se les hizo hemaglutinación (HA); a los mayores de esta edad se les corrió la prueba de HI. Además se hicieron observaciones y anotaciones por aspecto macroscópico de los fetos, si eran normales se anotaba N, si presentaban algún grado de momificación se calificó:

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados de serología a nivel de frigoríficos y de granjas muestran gran variabilidad; los porcentajes de positividad (títulos $\geq 1:160$), oscilaron entre 28.3% al 100% para los sitios de sacrificio de animales, y en granjas la positividad fue del 100%.

En cuanto a machos y hembras, hubo diferencias entre los mataderos en forma individual, pero al análisis de todos los sitios de muestreo en conjunto, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sexos.

Las cifras correspondientes a este ensayo están consignadas en las Tablas Nos. 1-A y 1-B.

FRIGORIFICO	GUADALUPE	SUIZO	SAN MARTIN
Títulos GMT:			
Hembras	2518.8	735.2	546
Título menor	1:20	1:160	1:20
Título mayor	>81920	1:5120	1:10240
Machos	789.8	788	4300
Título menor	1:160	1:160	1:20
Título mayor	1:10240	1:10240	>81920
Media aritmética	14006	2216	3403
% positivos	77.5	100	28.3

En cuanto a las pruebas realizadas en los fluidos corporales, se presentó una gran variabilidad en el comportamiento de títulos dependiendo del sitio de toma de muestras; los índices de positividad variaron de 0.0% hasta 43.75%. El mayor índice de posi-

tividad se presentó en los líquidos torácicos colectados de fetos provenientes de granjas; a nivel de planta de sacrificio los porcentajes fueron menores (Tabla 2).

Catabolismo de anticuerpos maternos: en este experimento también se determinó una significativa variabilidad del comportamiento de los títulos y de la curva de regresión de los mismos. Al analizar las medias presentadas por los sitios de muestreo observamos lo siguiente:

Tecniagro	=	396.1
Santa Cruz	=	1355.5
Santa Rita	=	235.8
Porcilandia	=	2288.2

En el análisis de varianza, se encontraron diferencias estadísti-

cas altamente significativas ($p < 0.01$).

En el análisis de regresión se observó en todos los casos que la declinación de los títulos no fue simplemente lineal; la regresión que presentaron las curvas fue de

SITIO PROCEDENCIA	GUADALUPE	CENTRAL	SAN MARTIN	GRANJAS
Fetos positivos:				
HA	6	8	-	-
Título menor	1:2	1:2	-	-
Título mayor	1:4	1:4	-	-
HI	4	2	-	7
Título menor	1:20	1:20	-	1:20
Título mayor	1:40	1:40	-	1:10240
% positivos	7.45	17.8	0.0	43.75

**TABLA 1-B
SEROLOGIA A NIVEL DE GRANJAS**

GRANJA	086-216	STA. CRUZ	STA. RITA
Títulos GMT:			
Hembras	3244	6894.4	4315
Título menor	1:160	1:160	1:320
Título mayor	1:40960	1:40960	1:20480
Machos		4256	
Título menor		1:10240	
Título mayor		1:10240	
Media aritmética	6098	1272	1168
% positivos	100	100	100

tipo exponencial (cuadrática), con una acelerada pendiente al principio del ensayo y luego un descenso moderado. El porcentaje de declinación de los títulos durante el ensayo fue aproximadamente del 98%.

Las cifras globales de los resultados en el experimento de catabolismo de anticuerpos maternos derivados, están consignados en la Tabla 4.

En las figuras 1, 2, 3 y 4 se aprecian las curvas de regresión presentadas en cada uno de los departamentos y en cada una de las granjas. En el departamento de Antioquia (Figura 1), todas las muestras provenían de una sola empresa productora de cerdos, por lo tanto se analizaron como una sola cohorte, pues el nivel de tecnología empleado es el mismo y la procedencia de los animales es interna.

La Figura 2, muestra a la curva de regresión de los títulos de las cerdas muestreadas en el departamento del Valle. Para el depar-

tamento de Cundinamarca (Figuras 3 y 4), se hizo análisis independiente para las granjas, pues éstas tienen algunas diferencias en cuanto al manejo de los animales y el nivel de tecnología empleado lo mismo que la procedencia de los animales. Otro aspecto importante es que las dos explotaciones muestreadas están ubicadas en pisos térmicos diferentes.

Las Figuras 5 y 6, nos muestran en conjunto el comportamiento de las curvas de regresión, con sus respectivos grados de deflexión. En el ensayo de estandarización de peroxidasa (Figuras E-1 y E-2), los resultados obtenidos son promisorios, en estudios posteriores se puede ya trabajar directamente con improntas de tejidos para comparar resultados. Esta es una metodología que se puede implantar en un laboratorio con limitaciones de equipos; esta es una ventaja comparativa con pruebas de fundamento similar como inmunofluorescencia que necesitan de equipos muy costosos.

TABLA 3 CATABOLISMO DE ANTICUERPOS MATERNALES							
SANGRIA	1	2	3	4	5	6	7
Títulos GMT:							
Porcilandia/1	583.6	208	210.6	76.4	40.0	21.9	10.0
Santa Cruz/2	2958	1436.8	604.1	203.7	130.7	50.4	30.0
Santa Rita/3	686	320	226.3	85.7	34.8	17.4	8.7
086-216/4	820	312.2	215.4	141.4	110.3	40.0	7.0
Semanas	5	8	11	14	17	20	23
Porcentaje:							
/1	100	35.7	34.5	13.1	6.8	3.7	1.7
/2	100	48.6	20.4	6.9	4.4	1.7	1.0
/3	100	46.6	33.0	12.5	5.1	2.5	1.3
/4	100	40.0	27.6	18.1	14.4	5.3	0.9

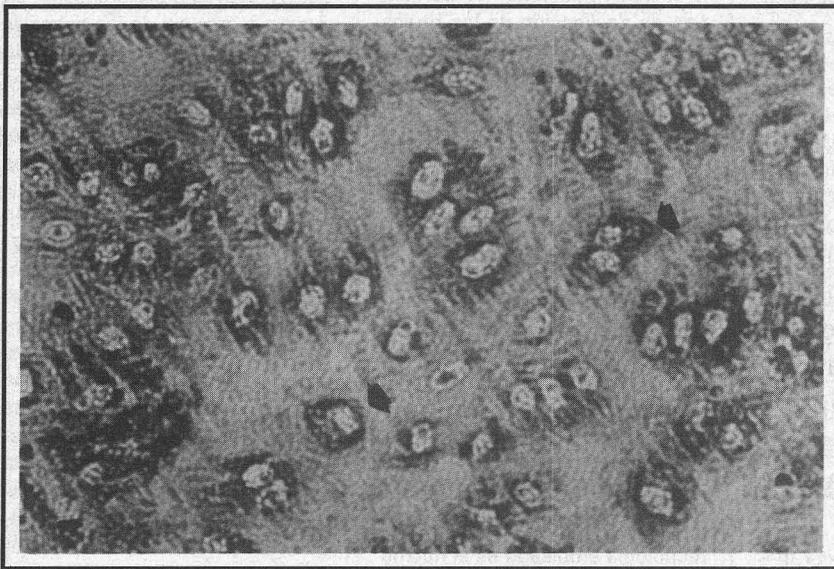


FIGURA E-1. Peroxidasa Positiva (150 X).

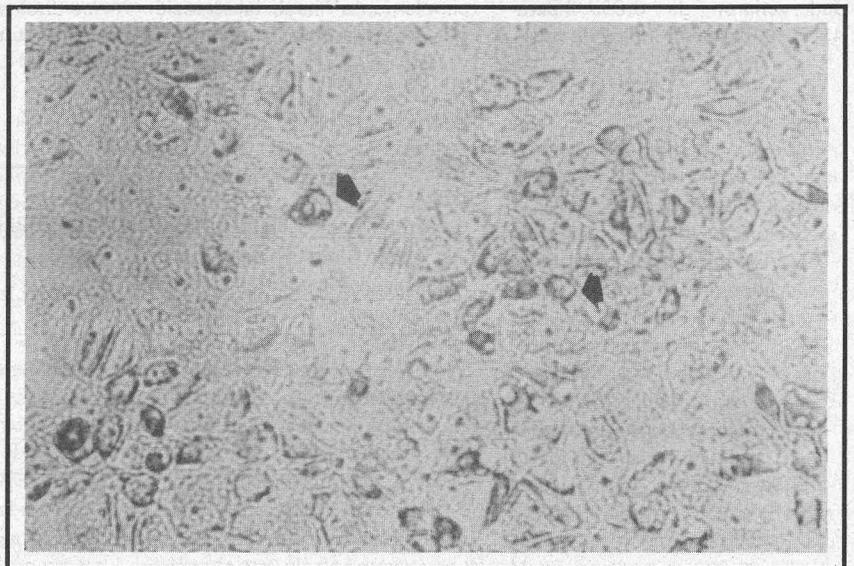


FIGURA E-2. Control negativo peroxidasa (150 X).

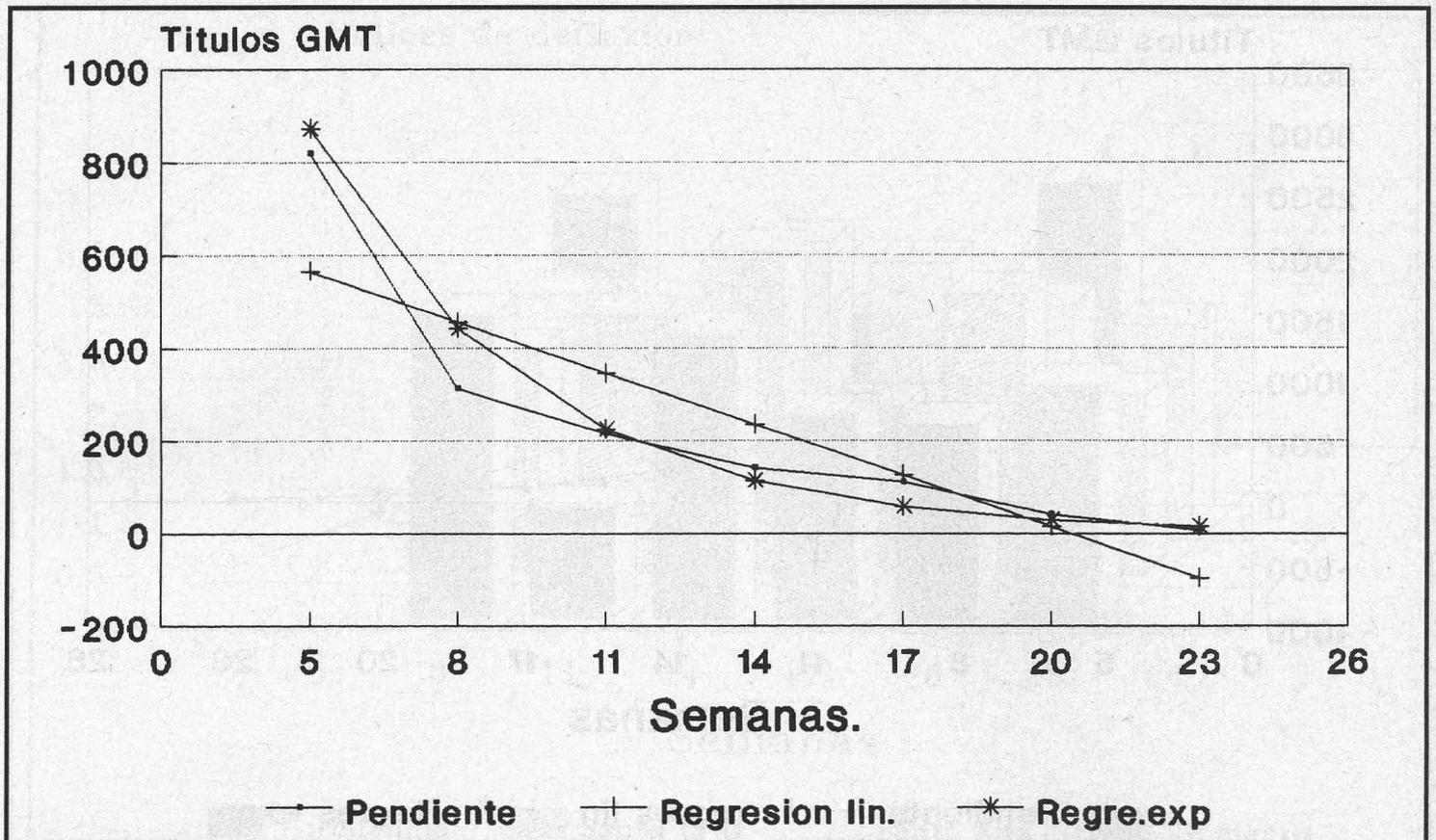


FIGURA 1. Catabolismo de anticuerpos maternos (Tecniagro - Medellín).

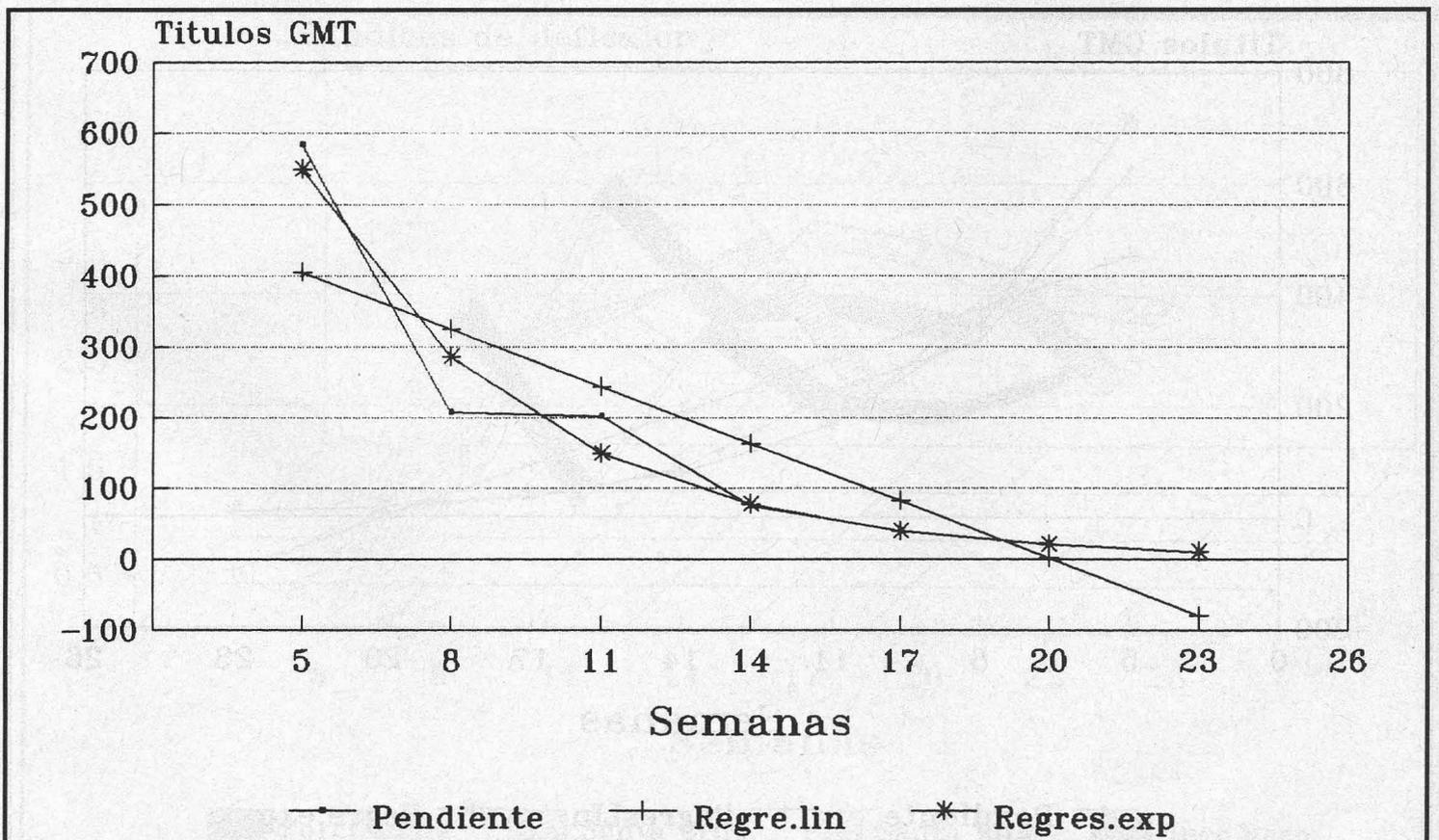


FIGURA 2. Catabolismo de anticuerpos maternos (granjas Valle del Cauca).

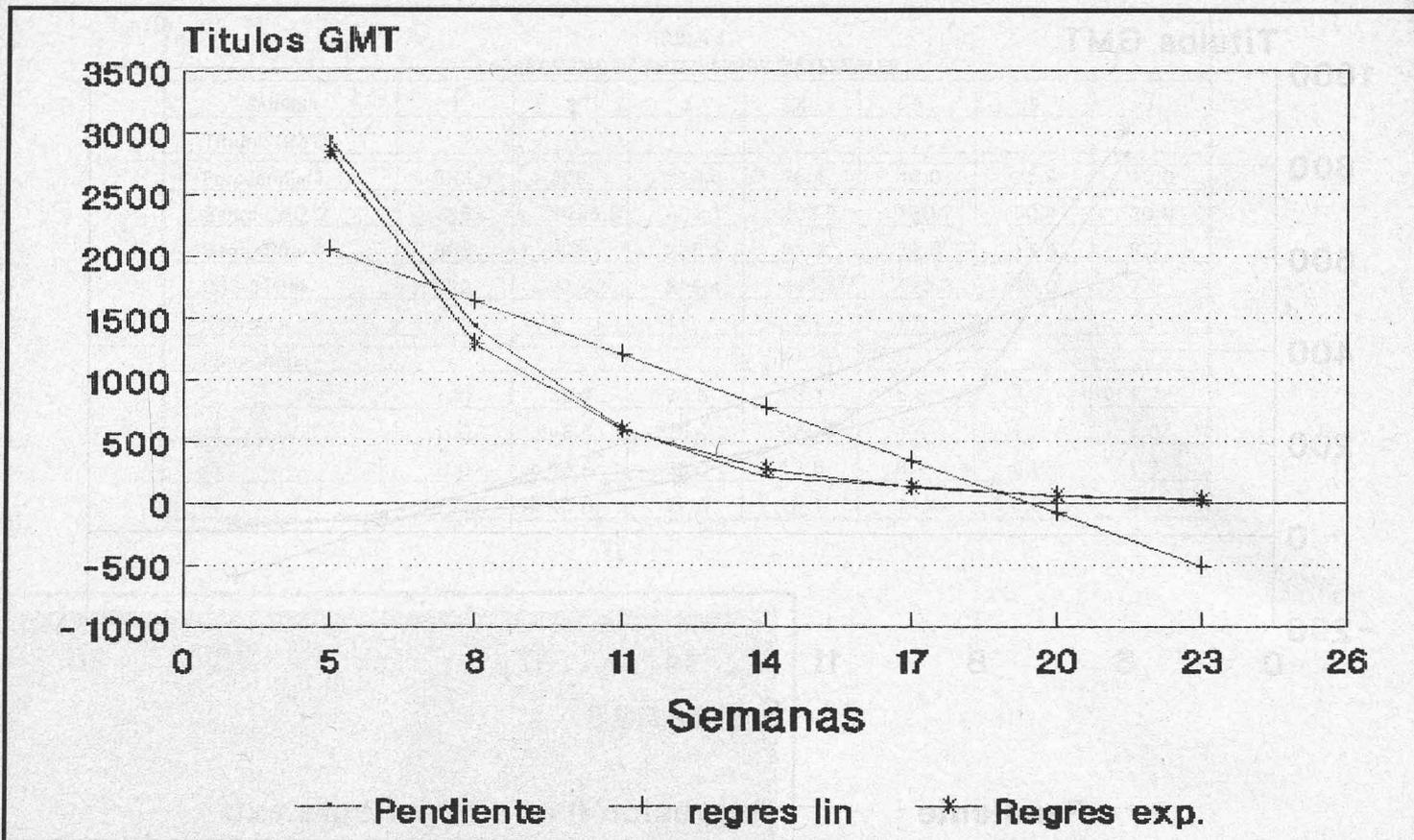


FIGURA 3. Catabolismo de anticuerpos maternos (Gachancipá).

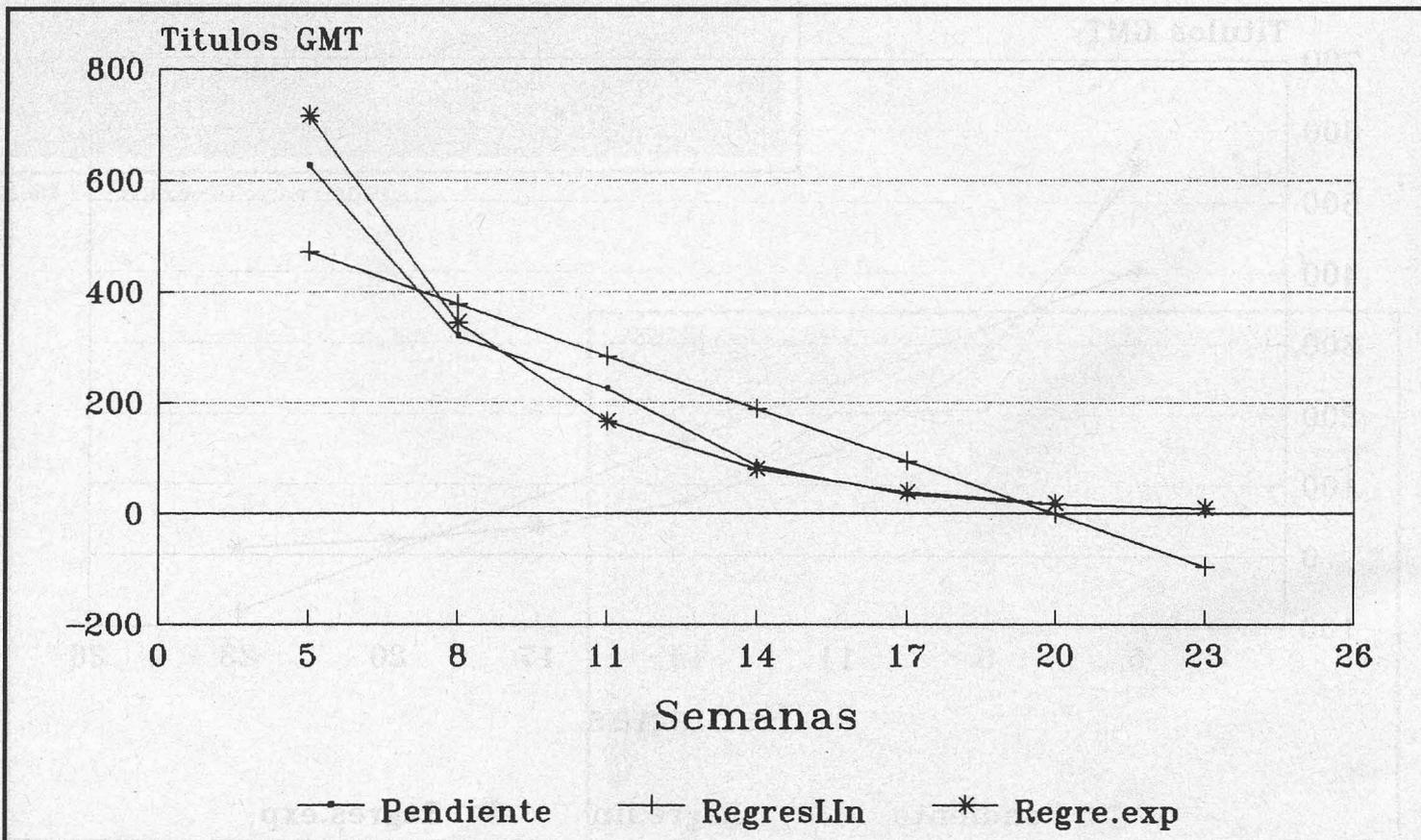


FIGURA 4. Catabolismo de anticuerpos maternos (Silvania).

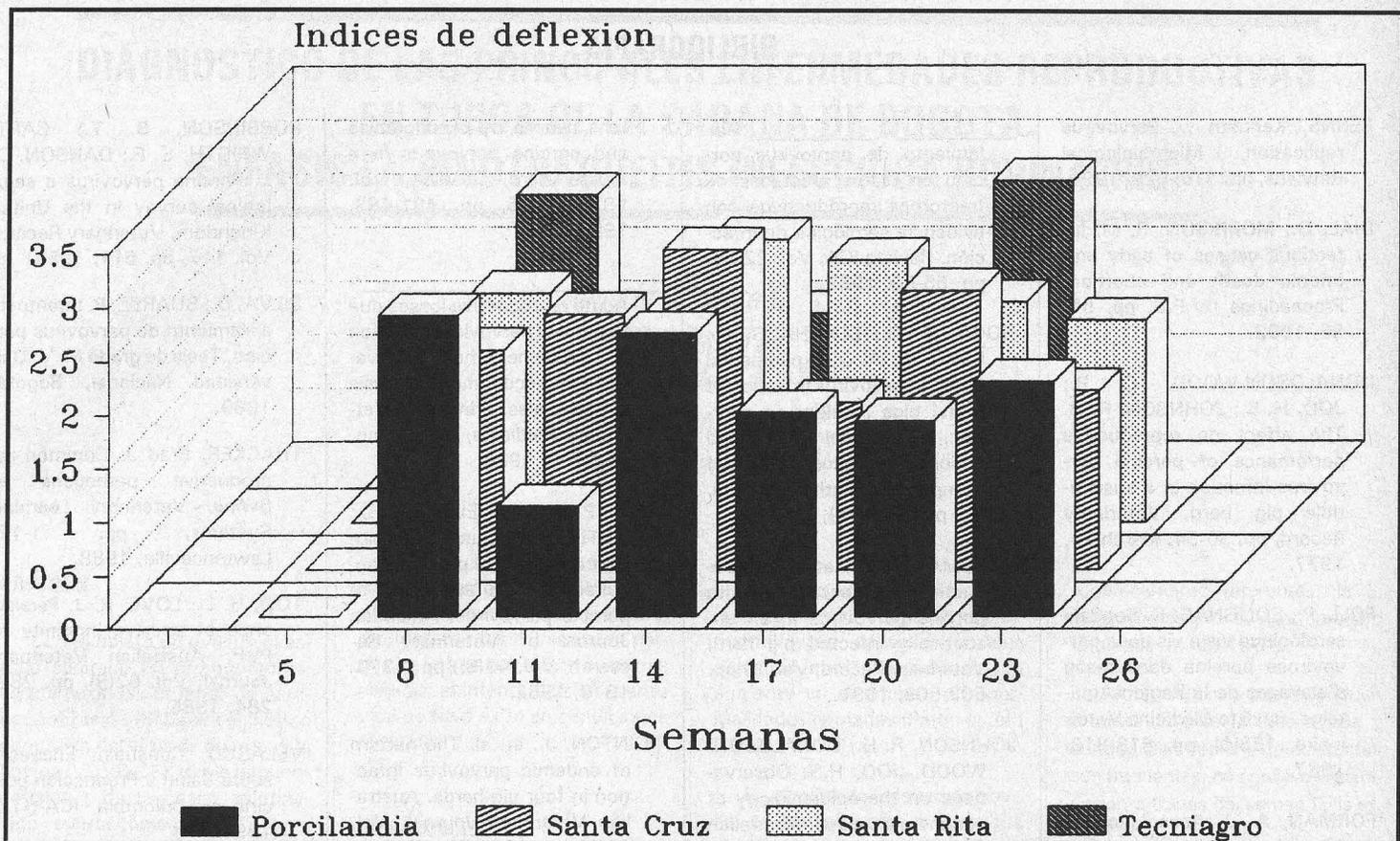


FIGURA 5. Comportamiento curva de regresión (parámetros de deflexión).

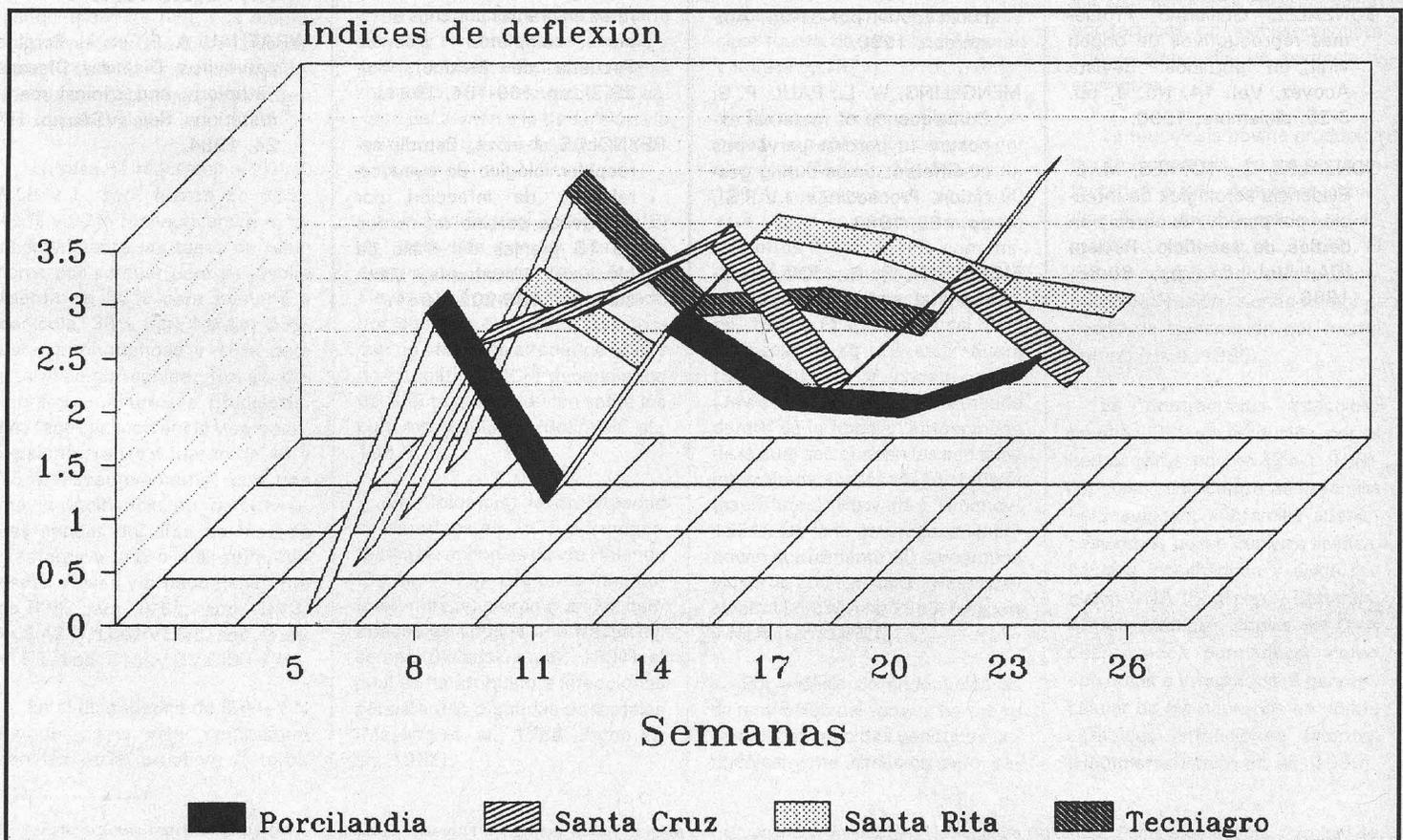


FIGURA 6. Comportamiento curva de regresión (índices de deflexión).

BIBLIOGRAFIA

- BERNS, Kenneth I., Parvovirus replication, *Microbiological Reviews*, pp. 316-329, 1990.
- DIAL, G.; MORRISON, R. M. Infectious causes of early embryonic death and abortion. *Proceedings I.V.P.S.* pp. 51-55, 1992.
- DONALDSON-WOOD, C. R.; JOO, H. S.; JOHNSON, R. H. The effect on reproductive performance of porcine parvovirus infection in a susceptible pig herd. *Veterinary Record*, pp. 30-34, March 19, 1977.
- FOLL, P.; SOLIGNAC, C. Sondaje serológico vis a vis de la parvovirose porcina dans reseu d'élevages de la Region Aquitaine. *Revisite Medicine Veterinaire*, 138(0), pp. 813-818, 1987.
- FORMAN, A. J. Association of Parvovirus with an outbreak of foetal death and mummification in pigs. *Australian Veterinary Journal*, Vol. 53, 1977.
- GONZALEZ, Guillermo. Problemas reproductivos de origen viral en porcinos, *Revista Acovez*, Vol. 14, No. 4, pp. 9-25, diciembre, 1990.
- GONZALEZ, G.; TORRES, M. L. Evidencia serológica de infección por parvovirus porcino en cerdos de sacrificio. *Revista ICA*, Vol. 21, pp. 80-85, 1986.
- _____, _____. Aislamiento de parvovirus porcino en piaras afectadas de trastornos reproductivos con evidencia serológica de infección. *Revista ICA*, Vol. 22 (2), pp. 55-58, 1987.
- HOGG, G. G.; LENGHAUS, C.; FORMAN, A. J. Experimental porcine parvovirus infection of foetal pigs resulting in abortion, histological lesions and antibody formation. *Journal of Comparative Pathology*, Vol. 87, pp. 539-549, 1977.
- HUYSMAN, C. N. et. al. Reproductive failure associated with porcine parvovirus in an enzootically infected pig herd. *Veterinary Record*, Vol. 31 pp. 503-506, 1991.
- JOHNSON, R. H.; DONALDSON-WOOD, JOO, H.S. Observations on the epidemiology of porcine parvovirus. *Australian Veterinary Journal*, Vol. 52, pp. 80-81, 1986.
- MENGELING, W. L. in: *Virus infections of porcines*, Elsevier Publications, pp. 81-94, Amsterdam, 1990.
- MENGELING, W. L.; PAUL, P. S. Consequence of maternal exposure to porcine parvovirus at different times during gestation. *Proceedings, I.V.P.S.*, pp. 162, 1982.
- MORRISON, R. B.; JOO, H. S. Prenatal and preweaning defects caused by pseudorabies and porcine parvovirus in a Swine Herd, *JAVMA*, Vol. 187, No. 5, pp. 481-483, 1985.
- _____, _____. Acute reproductive losses due to porcine parvovirus infection in a swine herd, herd observations and economical analysis of the losses. *Preventive Veterinary Medicine*, Vol. 2, pp. 699-706, 1984.
- PAUL, P. S.; MENGELING, W. L.; PIRTLE, E. C. Duration of biological half-life of passively acquired colostral antibodies to porcine parvovirus. *American Journal of Veterinary Research*, Vol. 43(8), pp. 1376-1379, 1982.
- POINTON, J., et. al. The pattern of endemic parvovirus infection in four pig herds. *Australian Veterinary Journal*, Vol. 60(6), pp. 166-171, 1983.
- RAMIREZ, H., et. al. Seroprevalencia de anticuerpos contra parvovirus porcino en cerdas y ratas en granjas porcinas de ciclo completo. *Técnica Pecuaria de México*, Vol. 29(3), pp. 159-164, 1991.
- REYNOLDS, J. et. al., Estudio seroepidemiológico de pseudorabia y de infección por parvovirus porcino en cerdos de 18 granjas del Valle de Mexicali. *Veterinaria Mexicana*, pp. 199-202, 1984.
- ROBBINSON, B. T.; CARTWRIGHT, S. F.; DANSON, D. L. Porcine parvovirus a serological survey in the United Kingdom, *Veterinary Record*, Vol. 117, pp. 611, 1985.
- SILVA, D.; SUAREZ, P. Intento de aislamiento de parvovirus porcino, Tesis de grado M. V. Universidad Nacional, Bogotá, 1989.
- THACKER, Brad J. Common reproductive pathogens in Swine, *Veterinary Learning Systems*, pp. 1-12, Lawrenceville, 1988.
- TOO, H. L.; LOVE, R. J. Persistence of passive immunity to PVP. *Australian Veterinary Journal*, Vol. 62(8), pp. 282-284, 1985.
- VELASCO, Consuelo. Encuesta sobre Salud y Producción porcina en Colombia, ICA-GTZ, 1991.
- WALTON, J. R. Porcine parvovirus doesn't affect all foetuses. *Rev. Pigs*, pp. 11-13, July-August, 1987.
- WRATHAL, A. E., et. al. Porcine parvovirus Disease, *Disease Pathology and clinical manifestations*, Rev. IVSA, pp. 19-24, 1984.