

## **Interacciones entre el virus del PRRS y *Mycoplasma hyopneumoniae***

Eduardo Fano-González

Carlos Pijoan

Scott Dee

Swine Disease Eradication Center, University of Minnesota

Durante la última década *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae*) y el virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio del Cerdo (PRRS) han sido considerados como dos de los principales agentes involucrados en los procesos de enfermedad respiratoria en animales en crecimiento. De hecho, ambos agentes son protagonistas del denominado complejo respiratorio porcino (PRDC), el cual como bien sabemos es un síndrome multietiológico, que resulta de la infección e interacción de varios patógenos respiratorios. El PRDC está considerado como la principal causa de mortalidad y disminución en el desempeño de cerdos durante su etapa de crecimiento y engorde. Por lo anterior el entendimiento de los mecanismos de patogenicidad e interacción de los dos principales agentes de este síndrome ha sido causa de investigación.

En base a observación clínica de los cuadros respiratorios durante la fase de crecimiento y engorde, originalmente se maneja la teoría que la infección por el virus del PRRS ocasionaba un incremento en la severidad del cuadro clínico ocasionado por *M. hyopneumoniae*. La anterior suposición se fundamentaba con la idea de que la infección del virus del PRRS comprometía el sistema inmunológico del cerdo permitiendo que la neumonía por *M. hyopneumoniae* fuera más severa. En un estudio con el objetivo de determinar si esta aseveración era verdadera, Van Alstine y colaboradores (1996) trabajaron con un modelo de infección mixta en cerdos jóvenes, infectando los animales inicialmente con el virus del PRRS y 7 días después con *M. hyopneumoniae*. La severidad de la infección mixta fue comparada con la observada en un grupo infectado nada más con *M. hyopneumoniae*. Finalmente ellos concluyen que bajo las condiciones experimentales presentadas en su estudio la infección por el virus del PRRS no incrementó la severidad de la infección producida por *M. hyopneumoniae*.

Thacker y colaboradores (1999) en un estudio dirigido a esclarecer la interacción entre estos dos agentes, desarrollaron un modelo experimental donde evaluaron tres diferentes

formas de interacción: los animales fueron inoculados con *M. hyopneumoniae* 21 días antes de, simultáneamente con y después de 10 días de la inoculación con el virus del PRRS. El estudio concluye que inversamente a lo que se creía, la infección de *M. hyopneumoniae* prolonga y exagera la enfermedad respiratoria inducida por el virus del PRRS y también se plantea que dicho poder aditivo es independiente del momento de la infección viral. El mecanismo de cómo se da esta interacción aun no está muy claro, pero se han sugerido las siguientes teorías:

- La activación de Linfocitos T y su producción de citocinas proinflamatorias, estas promueven y prolongan la respuesta inflamatoria (Thanawongnuwech, et al, 2001). Se ha demostrado que en cerdos infectados con ambos agentes los niveles de IL-12 a los 42 días post-infección son superiores a los expresados por cerdos infectados solo con PRRS (Thanawongnuwech et al, 2003). Este estudio sugiere la posibilidad de que los elevados niveles de IL-12 pudieran comprometer la habilidad del sistema inmune para eliminar el virus del PRRS de los pulmones. Esto podría explicar la prolongada presencia del virus y el incremento de neumonía en cerdos con la infección mixta.
- La habilidad de *M. hyopneumoniae* de reclutar macrófagos en el pulmón, pudiera permitir que el virus del PRRS persista en los pulmones a niveles bajos por periodos prolongados. Esto pudiera ser mediante la interacción con estas células (mayor replicación) o mediante la inducción de respuesta inflamatoria (Thacker et al, 1999).

Un dato muy interesante generado en este estudio, es que los niveles en tejido pulmonar de los dos agentes no mostraron un incremento en los grupos con infección mixta comparados con los animales con la infección sencilla, ya sea para PRRS o *M. hyopneumoniae*. Esto favorece a la teoría que el efecto aditivo de *M. hyopneumoniae* es debido a la respuesta inflamatoria presentada durante curso de esta enfermedad. Por otro lado le resta atención a la teoría que soporta la idea de que el aumento de la severidad y duración de la neumonía inducida por el virus del PRRS sea debido a un incremento de la replicación de este agente. Los hallazgos encontrados en esta investigación le otorgaron un interés especial a la interacción de estos agentes, por lo tanto el control de la mycoplasmosis en los cuadros de PRDC tomo prioridad. Después de la aparición de esta información, un par de estudios se

llevaron a cabo con el objetivo de determinar si la vacunación en contra de *M. hyopneumoniae* y/o el virus del PRRS eran capaces de disminuir la neumonía asociada a este último. Los dos estudios concluyeron similarmente, describiendo que la vacunación en contra de *M. hyopneumoniae* disminuye pero no elimina la potencialización de la neumonía inducida por el virus del PRRS en las infecciones mixtas (Thaker et al, 2000; Silin et al, 2001). En uno de los dos estudios (Thacker et al, 2000), también se concluye que la vacunación en contra del virus del PRRS o el desafío por el virus de campo disminuye el efecto de la vacuna en contra de *M. hyopenumoniae*, y consideran que esto podría ser la explicación de la falla de la vacuna en el campo, sin embargo no se tiene conocimiento exacto de cual sería el mecanismo que ocasiona el bloqueo del efecto de la vacuna.

La información generada en las investigaciones previamente descritas revela el efecto aditivo que tiene la infección de *M. hyopneumoniae* sobre la severidad y duración en la neumonía asociada al virus del PRRS, es decir que la información ha sido dirigida a mecanismos de interacción en términos de patogenicidad. Nuestro equipo recientemente realizó una serie de estudios encaminados a determinar si esta característica aditiva previamente descrita tiene efecto sobre las características epidemiológicas y virológicas del PRRS, tales como transmisión, viremia y persistencia.

En un estudio evaluamos la transmisión por aerosol de la infección mixta de *M. hyopneumoniae* y el virus del PRRS, donde se maneja la hipótesis que la transmisión aérea del virus del PRRS sería demostrable al intentar transmitir el agente desde una población sufriendo la infección mixta a un grupo de cerdos centinelas. Se llegó a esta hipótesis al tener el expediente que previos estudios realizados en esta misma universidad no habían logrado demostrar la transmisión aérea utilizando un modelo de infección solamente con PRRS. Esta hipótesis fue también fundamentada por los estudios que describen el efecto aditivo de *M. hyopneumoniae* sobre el virus del PRRS en términos patológicos. El objetivo del estudio fue determinar si la co-infección con *M. hyopneumoniae* favorece la transmisión vía aire del virus del PRRS y para lograr este fin se utilizó un modelo que consistió en crear una población (n=60) infectada por ambos agentes. Los animales fueron inoculados y alojados en un edificio convencional de engorda (ventilación mecánica). Una vez

demostrada la infección mixta en estos animales, dos grupo de centinelas alojados en pequeños “trailers” fueron posicionados en los costados de la “nave infectada”. El trailer A se colocó en el lado norte de la nave a 6 metros de los extractores que expulsaban el aire proveniente del interior de la “nave infectada” y para asegurarnos que los cerdos centinelas tuvieran una mejor exposición de los aerosoles generados en el interior de la nave, se conectó un tubo PVC de 10 centímetros de diámetro de uno de los extractores al interior del trailer. En el lado sur de la “nave infectada” se colocó el trailer B a un metro de distancia de los extractores, permitiendo contacto directo con el aire proveniente del interior de la nave (en este trailer no se utilizó tubo). Los animales centinelas fueron expuestos al aire de la nave infectada por 7 días, después de esto los cerdos fueron trasladados a otras instalaciones a cumplir 3 semanas de período de incubación. Al final de este periodo los animales fueron enviados al laboratorio de diagnóstico para determinar su status con respecto a los agentes en estudio. La transmisión por aerosol del virus del PRRS no fue demostrada, sin embargo si lo fue en el caso de *M. hyopneumoniae* (en los dos trailers), lo cual demuestra que el modelo utilizado funciona y pone de manifiesto que la transmisión vía aire del virus del PRRS puede ser un evento infrecuente o menos probable al compararse con otros agentes. Por lo tanto finalmente concluimos en este estudio que la infección por *M. hyopneumoniae* aparentemente no tiene un efecto sobre la transmisión aérea del virus del PRRS, al menos bajo las condiciones de este experimento.

En otro estudio evaluamos la dinámica de infección, viremia y persistencia del virus del PRRS en animales previamente infectados con *M. hyopneumoniae*. Para la realización de este estudio utilizamos 60 cerdos de 2 meses de edad, provenientes de una fuente libre del virus del PRRS y *M. hyopenumoniae*. 28 cerdos fueron inoculados con *M. hyoneumoniae* mediante la vía intratraqueal en el día 0 del estudio y en el día 35 los mismos animales fueron intranasalmente infectados con el virus del PRRS. Los animales inoculados fueron colocados en 4 diferentes corrales (7 animales por corral). 12 cerdos fueron distribuidos en los 4 corrales ocupados por los animales inoculados (3 por corral) y fueron asignados como el grupo “contacto directo”. Los restantes 20 animales fueron ubicados en dos corrales independientes, pero localizados en la misma nave, estos cerdos fueron asignados como el grupo “contacto indirecto”. Con el fin de evaluar la dinámica de infección, 12 animales

inoculados, 12 contactos directos y 10 contactos indirectos fueron repetidamente evaluados para determinar su status de infección con respecto a los agentes en estudio. Las muestras a colectar fueron suero para PCR de PRRS y ELISA para ambos agentes, e hisopos nasales. La infección por *M. hyopneumoniae* fue confirmada por la detección de anticuerpos específicos y por la detección del agente mediante una técnica de PCR anidado. Con respecto a PRRS, los resultados de la dinámica de infección y viremia se muestran en la Tabla 1. El virus del PRRS mostró similar dinámica de infección y patrón serológico a los descritos en previos estudios donde evalúan la infección única del virus (Otake et al, 2002; Batista, 2002). En los primeros 7 días post-infección hay evidencia de transmisión del virus a los animales asignados como contactos directos e indirectos. La viremia fue detectada hasta los 28 días post-infección, dato que queda dentro del rango descrito en diferentes estudios (28 a 42 días, dependiendo de la edad de los animales) (Batista et al, 2002; Shibata et al, 2000; van der Linden et al, 2003).

**Tabla 1.** Dinámica de infección, seroconversión y viremia del virus del PRRS en los animales inoculados, contactos directos y contactos indirectos. Co-infección con *M. hyopneumoniae*

D E	DPI	Inoculados		Contactos Directos		Contactos Indirectos	
		PCR	ELISA	PCR	ELISA	PCR	ELISA
35	0	0/11*	0/11	0/12	0/12	0/10	0/10
42	7	10/10	0/10	5/12	0/12	1/10	0/10
49	14	10/10	10/10	12/12	4/12	6/10	1/10
63	28	10/10	10/10	10/12	12/12	20/20	18/20
91	56	0/10	10/10	0/10	12/12	1/20	20/20
119	84	0/10	10/10	0/10	12/12	0/20	20/20
155	120	0/10	10/10	0/10	12/12	0/20	20/20

\* Numero positivos/Numero muestreados

DE: Días del estudio

DPI: Dias post-infección

Para evaluar la persistencia del virus, los animales fueron enviados al matadero en tres diferentes fechas 120, 135 y 150 días post-inoculación. Muestras de tejidos (tonsila y linfonodos) fueron tomadas en cada animal y procesadas para PCR. Los resultados se

muestran en la Tabla 2. Se detectaron animales persistentemente infectados hasta los 150 días post-infección en una baja proporción. Lo anterior concuerda con otro estudio donde se evaluó la persistencia del virus en animales exclusivamente infectados con PRRS (Wills et al, 2003).

**Tabla 2.** Persistencia del virus del PRRS en animales infectados con *M. hyopneumoniae*.

Days pi	Directamente inoculados	Animales contactos*
<b>120</b>	4/8	0/6
<b>135</b>	0/9	0/6
<b>150</b>	2/9	0/6

\* La proporción de los contactos directos y contactos indirectos se presenta junta.

Esta información parece indicar que características como dinámica de infección, viremia y persistencia del virus del PRRS en co-infección con *M. hyopneumoniae* no presentan un patrón diferente al descrito en los estudios donde se evalúa infección solo por PRRS. Quizás esta potenciación podría estar limitada a características individuales y no en términos de grupos de animales, y para demostrar esto hace falta mas investigación que defina perfectamente cual es el papel de esta interacción en términos de dinámica poblacional.

## Referencias

- Van Alstine WG et al. (1996) *Veterinary Microbiology* 49:297-303
- Thacker EL et al. (1999) *J Clin Microbiology* 37(3):620-627
- Thanawongnuwech R et al. (2001) *Veterinary Immunology and Immunopathology* 79:115-127
- Thanawongnuwech R et al. (2003) *Viral Immunology* 16(3):357-367
- Thacker EL et al. (2000) *Vaccine* 18:1224-1252
- Silin DS et al. (2001) *Acta Vet Brno* 70:415-420
- Otake S et al. (2002) *Veterinary Record* 150:804-808
- Batista L et al. (2002) *Canadian Journal of Veterinary Research* 66:196:200
- Van der Linden IF (2003) *Vaccine* 21:1952-1957
- Shibata I et al. (2000) *J Vet Med Sci* 62(1):105-108
- Fano EA et al. *Veterinary Record*, Aceptado para publicación