

COINFECCIÓN EXPERIMENTAL DEL *RUBULAVIRUS PORCINO* Y VIRUS DE LA INFLUENZA PORCINA (H1N1) EN CERDOS EN CRECIMIENTO

Rivera-Benítez JF^{1*}, Gómez-Núñez L¹, De la Luz-Armendáriz J², Sánchez-Betancourt I², Hernández J³, Martínez LA¹, Ramírez-Mendoza H².

¹CENID-MA, INIFAP. ²FMVZ, UNAM. ³CIAD, AC.

*email: rivera.francisco@inifap.gob.mx

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades respiratorias en cerdos son una de las causas más importantes que generan grandes pérdidas económicas en la industria porcina (1). Los principales agentes virales involucrados con la presentación del complejo respiratorio y neumonía en cerdos en crecimiento son: vPRRS, virus de influenza porcina, *Herpesvirus suis* tipo 1, *Rubulavirus porcino* (RVP), *Circovirus porcino* tipo 2 (PCV2) y *Coronavirus porcino*. Los cuales afectan de forma individual o interactuando entre ellos, ocurriendo también asociación con otros agentes infecciosos de origen bacteriano (2-7). No existen antecedentes de estudios experimentales en donde se evaluó la interacción o asociación del RVP con el virus de influenza porcina. Sin embargo, en las unidades de producción porcina en México, se presenta de forma común serología positiva, lo cual indica que la coinfección es un evento constante, preferentemente en zonas donde el RVP se ha establecido como un agente endémico (8, 9). La infección por RVP se establece persistentemente, generando como consecuencia una mayor susceptibilidad a infecciones secundarias, las cuales se pueden exacerbar al ocurrir una coinfección. El objetivo del presente estudio fue analizar el efecto de la coinfección experimental del rubulavirus porcino y el virus clásico de la influenza porcina H1N1 en cerdos en crecimiento.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se emplearon 24 cerdos híbridos, machos castrados, de seis semanas de edad, provenientes de una granja libre de enfermedad del ojo azul (EOA) e influenza porcina. Los cerdos fueron asignados al azar en cuatro grupos (Cuadro 1).

Grupo	No. de cerdos	Inoculación		Necropsia (dpi)
		Día 0	Día 44	
RVP/Mock	6	RVP	MEM	46, 52
RVP/swH1N1	6	RVP	swH1N1	46, 52
Mock/swH1N1	6	MEM	swH1N1	46, 52
Mock/Mock	6	MEM	MEM	46, 52

Cuadro 1. Diseño experimental

Se aplicó por instilación nasal 4 ml de la cepa PAC3 (caracterizada previamente por causar cuadros respiratorios en cerdos en crecimiento) del RVP a dosis de 1×10^6 DICC₅₀/ml a cada cerdo del grupo RVP/Mock y RVP/swH1N1. Posteriormente, a los 44 dpi se infectó a los cerdos del grupo Mock/swH1N1 y el grupo RVP/swH1N1, empleando 4 ml de swH1N1 a dosis de 1×10^5 DICC₅₀/ml vía intranasal (Cuadro 1). Los cerdos testigos negativos (Mock/Mock) fueron inoculados con medio de cultivo (MEM).

Se realizó la evaluación clínica diaria de los cerdos posterior a la infección; para cuantificar los signos clínicos se empleó el modelo descrito por Loeffen *et al.* (10), las características evaluadas fueron: actividad, frecuencia respiratoria, respiración abdominal y tos. Además, se registró la temperatura rectal y se obtuvieron diferentes muestras, previo y posterior a la infección. Las muestras colectadas fueron: hisopos nasales y orales y sangre sin anticoagulante para la obtención de suero (días -2, 0, 1, 3, 7, 14, 28, 43, 46, 50 y 52). Las necropsias fueron realizadas en dos tiempos, a los 46 y 52 días posinfección (empleando tres cerdos por grupo), para identificar el daño en la fase aguda de la coinfección. Durante las necropsias, todas las alteraciones macroscópicas fueron registradas y se colectaron secciones de órganos (mucosa nasal, tráquea anterior y bronquial, pulmón, tonsila, linfonodo mediastínico y traqueobronquial). Una sección de los órganos fue procesada para histología y otra sección para la cuantificación viral, mediante qRT-PCR para RVP y swH1N1. Con las muestras de suero se realizó la prueba de inhibición de la hemaglutinación para la detección de anticuerpos para ambos virus. El análisis estadístico de las lesiones microscópicas se realizó mediante una prueba no paramétrica (Kuskall-Wallis). El promedio de la temperatura rectal y la carga viral (en hisopos nasales y orales y en muestras de órganos) fue analizado mediante una prueba de *t* de Student con un nivel de significancia de $P \leq 0.05$.

RESULTADOS

Signos clínicos

En el grupo RVP/Mock y RVP/swH1N1, tres de seis cerdos presentaron secreciones nasales y conjuntivitis a los 4 días posinfección (dpi), continuando hasta los siete dpi en el grupo de la infección simple. En esos mismos grupos se registró pirexia (<39.7 °C) entre los días tres y siete posinfección (pi). El puntaje obtenido para la evaluación de signos respiratorios, demostró un incremento en la presentación del cuadro en los grupos RVP/Mock y RVP/swH1N1 a los siete dpi, retornando a valores basales a los 14 dpi. El cuadro presentado por los cerdos consistió en apatía y dificultad respiratoria. En los cerdos del grupo RVP/swH1N1 y Mock/swH1N1 se registró un aumento en la temperatura rectal a los 6 dpi (tres de seis cerdos en cada grupo). Las características clínicas que acompañaron la infección fueron, apatía y diarrea (tres de seis cerdos). No existieron diferencias significativas entre los grupos analizados. En los cerdos del grupo Mock/Mock, no se observaron alteraciones clínicas.

Lesiones macro y microscópicas

Se observaron lesiones macroscópicas solamente en un cerdo del grupo Mock/swH1N1 analizado a los ocho dpi con el virus de influenza. Se observó neumonía moderada localizada en los lóbulos craneal y diafragmático. Las lesiones microscópicas más comunes fueron, hiperplasia del tejido linfóide asociado a bronquios y neumonía intersticial, de leve a moderada, sin embargo, no se observaron diferencias ($P>0.05$) entre los grupos evaluados (Cuadro 2).

Cuadro 2. Promedio (\pm DE) del puntaje registrado en la evaluación histológica

Tipo de lesión*	Grupo		
	RVP/Mock	RVP/swH1N1	Mock/swH1N1
L1 (puntaje/4) [†]	1.67 \pm 0.52	1.67 \pm 1.21	2.17 \pm 0.75
L2 (puntaje /4)	1.50 \pm 0.55	1.0 \pm 1.10	1.17 \pm 0.41
L3 (puntaje /4)	1.33 \pm 0.52	1.17 \pm 1.17	1.17 \pm 0.98
L4 (puntaje /4)	0.17 \pm 0.41	0.50 \pm 0.55	0.67 \pm 0.52
Total (prom)	1.17 \pm 0.76	1.08 \pm 1.06	1.29 \pm 0.86
Total puntaje/16	4.67	4.33	5.17

*L1: hiperplasia del tejido linfóide asociado a bronquios. *L2: hiperplasia del tejido linfóide perivascular. *L3: neumonía intersticial. *L4: aumento en el número de macrófagos alveolares. [†]Lesiones (valor): 0, nulo; 1, leve; 2, moderada; 3, marcada; 4, muy marcada.

Serología

La presencia de anticuerpos contra RVP fue evidenciada en los grupos RVP/Mock y RVP/swH1N1, desde los siete dpi, hasta la conclusión del experimento. Para el virus de influenza se logró detectar la presencia de anticuerpos desde los primeros seis dpi en los grupos RVP/swH1N1 y Mock/swH1N1. En los grupos testigo no se observaron reacciones serológicas o contaminación entre los grupos.

Cuantificación de la carga viral de RVP y swH1N1

En muestras de secreciones nasales se detectó al RVP desde las primeras 24 horas posinfección y hasta los 28 dpi, en los grupos RVP/Mock y RVP/swH1N1. En hisopos orales, la detección y cuantificación se registró en periodos más prolongados (hasta 43 dpi), en los mismos grupos evaluados. En el grupo de la coinfección (RVP/swH1N1), se evidenció la reactivación y excreción en un 50% de los cerdos evaluados (entre los 50 y 52 dpi). La cuantificación promedio de la carga viral (Log_{10}) de RVP y swH1N1 en órganos de los cerdos de cada grupo, se presenta en los cuadros 3 y 4.

Cuadro 3. Promedio de la carga viral (copias de ARN/ml Log_{10}) del RVP

Grupos	Órganos linfoides*			Tracto respiratorio		
	Ton	LM	LTB	MN	T	Pul
RVP/Mock						
46 dpi	5.02	4.34	5.42	3.88	4.67	3.39
52 dpi	5.60	5.88	5.36	3.74	5.13	3.86
RVP/swH1N1						
46 dpi	6.64	6.88	5.09	4.59	0	3.91
52 dpi	6.54	5.86	6.56	4.22	3.64	4.28

*Se observaron diferencias significativas ($P<0.05$) en el promedio de la carga viral en estos órganos, en los grupos evaluados.

Ton: tonsila; LM: linfonodo mediastínico; LTB: linfonodo traqueobronquial; MN: mucosa nasal; T: tráquea; Pul: pulmón.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los signos clínicos observados en la fase de infección inicial con RVP corresponden a los reportados previamente en cerdos de edad similar (11).

Cuadro 4. Promedio de la carga viral (copias de ARN/ml Log_{10}) de swH1N1

Grupos	Órganos linfoides			Tracto respiratorio		
	Ton	LM	LTB	MN	T	Pul
Mock/swH1N1	0	0	3.5	0	5.75	0
46 dpi	0	0	0	7.41	3.80	8.62
52 dpi						
RVP/swH1N1						
46 dpi	0	3.5	5.11	0	3.40	6.27
52 dpi	0	4.76	0	0	0	5.13

Se observó secreción nasal, conjuntivitis y disminución de la actividad desde los cuatro hasta los siete dpi, en cerdos de menor edad (3-17 días) se presenta dificultad respiratoria y conjuntivitis a partir de los cuatro a los 10 dpi, pudiendo presentarse únicamente en el 40% de los animales infectados (12-14). Posterior a la coinfección con swH1N1, se observaron alteraciones en tres de seis cerdos analizados, sin embargo, sólo uno presentó disnea y descargas nasales, estas observaciones son diferentes a lo reportado en otros modelos de coinfección (4, 15, 16). En el presente modelo se optó por emplear cepas de baja virulencia o que afectan de manera moderada a cerdos de esta edad (RVP), la finalidad de ello fue reproducir lo que se observa en condiciones de granja, en donde las infecciones por estos agentes virales se han establecido como endémicas (9). La temperatura rectal no se ha considerado en estudios de infección experimental previos con RVP, bajo condiciones de granja, la fiebre se presenta en los primeros días de presentarse el brote (6). En el presente estudio se observó a los 4 dpi (grupo Mock/RVP y RVP/swH1N1), generando como consecuencia una disminución en el consumo de alimento y de la actividad general. El aumento de temperatura rectal en el grupo de coinfección (RVP/swH1N1) se observó en 3 de 6 cerdos, a los 4 dpi y en uno a los 6 dpi. En los cerdos infectados únicamente con swH1N1 se registró aumento de la temperatura rectal en la misma proporción. En estudios de coinfección o de infección simple con influenza se ha reportado fiebre a partir de los 2-7 dpi (M.hyo-influenza) (4), 4-10 dpi (PRRS-influenza) (16), 2-4 dpi (PRRS-influenza) (15), 1-3 dpi (influenza) (10). Esto refuerza la idea de que los signos asociados a la coinfección pueden pasar de manera subclínica, comparado con otros modelos similares. La puntuación obtenida con base en la evaluación de signos específicos de enfermedades respiratorias en cerdos, arrojó bajas puntuaciones en la fase de la infección con RVP, sin embargo son representativas del periodo de incubación y del cuadro subclínico que frecuentemente se reporta en condiciones de infección natural en cerdos en crecimiento (6). La puntuación más elevada se registró 6 dpi de la coinfección con swH1N1, posteriormente se observó otro repunte a los 15 dpi. Loeffen *et al.* (10), reportan valores similares en la infección simple con influenza, sin embargo en una fase más temprana, a los 2-3dpi. Los cerdos del grupo Mock/swH1N1 presentaron signos y temperatura

elevada posterior a la infección experimental en baja proporción, esto coincide con estudios en donde se han empleado cepas de virus de influenza de baja virulencia (17). La respuesta serológica se presentó a partir de los 6 dpi para RVP, la cual se mantuvo durante las 14 semanas que duró el experimento. La seroconversión se ha descrito anteriormente desde los 4 dpi (11), 8 dpi (17) y 10 dpi (14), se ha demostrado en infecciones experimentales, que la presencia de anticuerpos IHA persiste hasta por 20 semanas posinfección (18). Después de la infección con swH1N1 se observa un aumento en el título de anticuerpos a partir de los 6 dpi y hasta la conclusión del experimento. La curva de producción de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación para swH1N1 corresponde a la reportada por Van Reeth *et al.* (16). La cuantificación por RT-PCR en tiempo real permitió identificar resultados positivos para RVP y swH1N1. En muestras de hisopos nasales se detectó RVP desde las 24 horas posinfección, posteriormente disminuye la carga viral, llegando a ser negativos a los 28dpi. En los hisopos orales se presenta una situación similar en la primera fase, para posteriormente volver a detectar muestras positivas hasta los 50-52 dpi, en el caso de la infección con virus de la parotiditis en humanos, dicha muestra es la de elección para estudios de cuantificación viral (19-21). Con los resultados obtenidos se confirma la infección, seroconversión, excreción, distribución y reactivación del RVP en cerdos en crecimiento infectados con el virus de influenza porcina H1N1, se observó un aumento en la presencia de signos y alteraciones de temperatura y excreción viral significativa en fluido nasal en los grupos de coinfección, comparado con los de infección simple.

REFERENCIAS

1. Nakharuthai *et al.*, 2008; *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 39:1045-53.
 2. Morin *et al.*, 1990; *Can Vet J*. 31:837-9.
 3. Segalés *et al.*, 1997; *J Comp Pathol*. 116:387-95.
 4. Thacker *et al.*, 2001; *J Clin Microbiol*. 39:2525-30.
 5. Choi *et al.*, 2003; *Can Vet J*. 44:735-7.
 6. Kirkland P. D. & Stephano A. 2006. Diseases of swine. 9ª Edición. Blackwell Publishing. USA.
 7. Grau-Roma L & Segalés J. 2007; *Vet Microbiol*. 119:144-51.
 8. Avalos *et al.*, 2011; 1ra ed. España: Editorial Académica Española.
 9. Escobar-López *et al.*, 2012; *Transbound. Emerg. Dis*. 59: 416-420.
 10. Loeffen *et al.*, 2003; *Vet Immunol Immunopathol*. Mar 20; 92(1-2):23-35.
 11. Reyes-Leyva *et al.*, 2004; *Arch. Med. Vet*. 36: 39-47.
 12. Allan *et al.*, 1996; *J. Vet. Diagn. Invest*; 8: 405-413.
 13. Wiman *et al.*, 1998; *J. Neurovirol*. 4: 545-52.
 14. Cuevas *et al.*, 2009; *Vet. Immunol. Immunopathol*. 127:148-152.
 15. Van Reeth *et al.*, 2001; *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. May; 48(4):283-92.
 16. Van Reeth *et al.*, 1996; *Vet Microbiol*. Feb; 48(3-4):325-35.
 17. Busquets *et al.*, 2010; *Vet Res*. Sep-Oct; 41(5):74.
 18. McNeilly *et al.*, 1997; *J. Vet. Diagn. Invest*. 9: 3-9.
 19. Rivera-Benitez *et al.*, 2010; Proceedings of the 21st IPVS Congress. pp. 857. Vancouver. Canada.
 20. Uchida *et al.*, 2005; *J Med Virol*. 2005 Mar; 75(3):470-4.
 21. Krause *et al.*, 2006; *J Clin Virol*. Nov; 37(3):184-9.
- Proyecto financiado por Proyecto Recursos Fiscales, INIFAP, No. 19144832016 y PAPIIT IN 208814-3.