

## DISTRIBUCIÓN DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DEL OJO AZUL EN ÓRGANOS DE CERDOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE

Jasso M<sup>1\*</sup>, Ramírez H<sup>1</sup>, Rivera-Benítez JF<sup>2</sup>, Pérez A<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología e Inmunología, FMVZ, UNAM;

<sup>2</sup>Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal, INIFAP;

<sup>3</sup>Departamento de Biología Tisular y Celular, Facultad de Medicina, UNAM.

\*email: gavotta11@hotmail.com

### INTRODUCCIÓN

Las enfermedades de origen viral en cerdos repercuten considerablemente la producción alterando los parámetros productivos. La enfermedad del ojo azul (EOA) afecta a cerdos de todas las edades, el *Rubulavirus porcino* (RVP) es el agente causal de este padecimiento. Considerando que el RVP afecta todas las edades en las producciones y que persiste por más de 15 días en estudios previos, en este trabajo se estableció una cinética de infección en cerdos destetados a diferentes días posinfección (dpi), la distribución del RVP fue evaluada mediante la inmunoreactividad por medio de una inmunohistoquímica enzimática.

### MATERIAL Y MÉTODOS

#### *Animales de experimentación*

Se emplearon 12 cerdos machos híbridos de dos meses de edad.

#### *Virus*

Se empleó el aislamiento PAC-3 (Jalisco/1992), mismo que fue titulado mediante la evaluación de dosis infectantes en cultivo celular 50% (DICC<sub>50%</sub>) [1, 2]

#### *Muestras sanguíneas*

Se obtuvieron cinco ml de sangre por vía yugular de cada uno de los cerdos previos a la infección y a los siete, 14 y 28 días post infección (DPI).

#### *Infección experimental y necropsia*

Se infectaron nueve cerdos por vía intranasal con 5 ml de la cepa PAC-3 (Jalisco/1992) a una dosis de 10<sup>6</sup> DICC<sub>50%</sub>/ml. Los animales fueron monitoreados diariamente, como testigos negativos en la infección experimental se tuvieron tres cerdos sin infectar. Se realizaron necropsias en tres tiempos posteriores a la infección experimental (siete, 14 y 28 DPI). En todas las necropsias se realizó la inspección macroscópica y se colectaron muestras de 1 cm<sup>3</sup>, de pulmón, bazo, hígado, riñón, tonsila, bulbo olfatorio, mucosa nasal, bifurcación traqueal, ganglio mesentérico, ganglio gastro-hepático, ganglio bronquial, encéfalo anterior y posterior, cerebelo, nervio óptico, timo y ojo, que fueron fijadas en formol amortiguado al 10% durante 24 h.

#### *Inmunohistoquímica enzimática*

Las muestras se desparafinaron a 58°C por 15 min, posteriormente se colocaron con amortiguador de citrato de sodio (Bio SB, United States) bajo condiciones de presión a 120 °C durante 20 min. Se procedió a bloquear la actividad de peroxidasa endógena por 15 min con la solución de bloqueo del kit comercial (Bio SB, United States). Se realizó bloqueo, biotina y avidina, de acuerdo a lo sugerido en el paquete comercial (Invitrogen, Carlsbad, CA). Posteriormente, los cortes fueron incubados con 100µl de anticuerpo monoclonal (IgG de ratón) anti-HN a una

dilución 1/500 en diluyente de anticuerpo (Bio SB, United States) por 72 h en refrigeración. Se realizó un tercer bloqueo con suero de cabra normal al 5% por 1 h. Posteriormente se agregaron 150µl de anticuerpo biotinado del paquete comercial Bio SB (United States) por 15 min. Finalmente, se agregó 150µl estreptavidina con peroxidasa de rábano (Bio SB, United States) por 30 min a temperatura ambiente y la reacción fue revelada agregando 100µl de diaminobenzidina (Bio SB, United States) por 5min. La contrainfección se realizó con hematoxilina líquida por tres inmersiones.

La distribución del RVP fue evaluada mediante la inmunoreactividad contra la proteína HN del RVP en órganos de cerdos a los siete, 14 y 28 dpi. El criterio para considerar una muestra positiva fue la observación de un color marrón en citoplasma de células nucleadas. La distribución de la inmunoreactividad en los órganos de los cerdos infectados se valoró con cruces de acuerdo a la magnitud de la reacción: se consideró una inmunoreactividad fuerte (+++), moderada (++) , leve (+) e inmunoreactivo negativo (-).

#### *Inhibición de la hemoaglutinación*

Los sueros fueron colocados en placas de 96 pozos con fondo en U (Nunc), con 50µl de PBS, a partir del primer pozo se realizaron diluciones dobles seriadas, las cuales fueron de 1:2 hasta 1:2048. Posteriormente se agregaron 50µl de virus de la cepa PAC3, conteniendo ocho unidades hemaglutinantes (UHA) en cada pozo; se incubó 30 min a temperatura ambiente; posteriormente se agregaron 50µl de eritrocitos de bovino al 0.5% a toda la placa; la lectura fue realizada a los 60 min. Los sueros se consideraron positivos a partir de la dilución 1:16.

### RESULTADOS

#### *Signos clínicos*

En los animales se observó disnea, secreciones nasales y fiebre ligera de 39 a 39.3°C a partir del día dos y hasta el cuatro posinfección (pi) en tres cerdos, las secreciones nasales se registraron hasta los siete dpi.

#### *Análisis Inmunohistoquímico*

En el riñón de los cerdos de siete dpi la distribución de la inmunoreactividad se presentó en la médula renal, en epitelio tubular registrando una inmunoreactividad fuerte al virus (+++), la presencia del virus abarcó homogéneamente citoplasma de rayos medulares. Para el grupo de cerdos correspondiente a 14 dpi la reacción fue menos evidente, en tres cerdos se presentó inmunoreactividad moderada en epitelio tubular. La distribución del RVP se mantuvo en epitelio tubular, con una marca de (++) , inmunoreactividad moderada hacia el antígeno. El grupo de 28 (dpi) la

inmunoreactividad en el riñón fue menos evidente, inmunoreactividad ligera con una marca de (+).

Se visualizó inmunoreactividad leve en linfocitos de vasos eferentes tanto de tonsila así como de timo en animales sacrificados a siete, 14 y 28 dpi. El resto de los órganos analizados en este trabajo resultaron inmunonegativos en todos los animales sacrificados a siete, 14 y 28 dpi a la prueba de Inmunohistoquímica. Los cerdos testigos negativos no presentaron inmunoreactividad en ninguno de los órganos en este experimento.

#### *Análisis histológico*

Los resultados obtenidos revelaron alteraciones tisulares en pulmón en un 60% del corte histológico para los cerdos sacrificados a los 14 dpi, así como un 80% del corte histológico para los cerdos sacrificados a los 28 DPI, se visualizó una inflamación de tipo crónica así como una infiltración linfocitaria. Los cerdos de siete dpi y testigos negativos no presentaron esta alteración.

#### *Inhibición de la hemoaglutinación*

Se colectaron muestras de sangre antes del desafío y durante el mismo para todos los cerdos en el experimento. Los cerdos seroconvirtieron a partir del día siete pi, observando títulos con un valor promedio de  $2.17 \log_2$ . Del día siete al día 10 pi se obtuvieron títulos con un valor a  $5.33 \log_2$ , que posteriormente a los 14 dpi descenderían a un valor de  $4.5 \log_2$ , para los últimos dpi que van de 14 hasta el día 28 pi, incrementarían los títulos a un valor de  $6 \log_2$ , para descender por ultimo a un valor de  $5 \log_2$  y mantenerse así representando una meseta. Los cerdos testigos negativos no presentaron títulos de anticuerpos inhibidores.

### **DISCUSIÓN**

En este estudio se evaluó la presencia del RVP en una cinética de infección experimental. Los resultados obtenidos indican que la distribución viral en la infección experimental del RVP en cerdos destetados, pudo ser detectada mediante la prueba de inmunohistoquímica en epitelio tubular de la médula renal, linfocitos de vasos eferentes en tonsila y timo. Una gran cantidad de epitelio tubular inmunoreactivo a RVP se distribuyó ampliamente para los animales sacrificados a los siete dpi hasta los animales de 28 dpi donde fue menos evidente la reacción. En el proceso de maduración de los cerdos se presenta un cambio en los componentes de los receptores específicos que reconocen a las glicoproteínas virales, mediante estudios con lectinas [3], se determinó que el reconocimiento de los receptores en los tejidos es dependiente de la edad del cerdo. En comparación con este trabajo previo, en los animales infectados con RVP de este experimento no se pudo detectar inmunoreactividad en pulmón, pero si una inflamación en alveolos pulmonares de animales sacrificados de 14 dpi hasta los animales con 28 dpi. Esta inmunonegatividad y el engrosamiento alveolar con infiltración linfocitaria se generan por la respuesta inmune innata y adaptativa.

La EOA es un padecimiento de tipo persistente, el sistema inmune controla esta producción de proteínas virales mediante la respuesta inmune específica [4] mediante componentes liberados por células reactivas se genera una inflamación mediada por una hipersensibilidad de tipo 3. La

respuesta de anticuerpos de tipo inhibidores fue evaluada mediante la prueba de inhibición de la hemoaglutinación. En estudios anteriores se demostró que la prueba de inhibición de la hemoaglutinación comparada con otras pruebas como virus seroneutralización, inmunofluorescencia indirecta y ELISA de bloqueo, detectaron eficazmente anticuerpos de cerdos infectados [5]. Una característica de la infección con el RVP es la de generar una seroconversión permanente, en estudios previos la inmunidad a la infección por RVP en el cerdo adulto se identificaron anticuerpos tanto neutralizantes como inhibidores de la hemoaglutinación [1] En este trabajo se encontraron títulos de anticuerpos a partir del día siete para incrementarse al máximo en el día 17 y 23. Con la prueba de inhibición de la hemoaglutinación a partir de la primera semana se detectaron anticuerpos contra el virus con un título promedio de  $2.17 \log_2$ . Serologías previas a la infección de todos los animales, mostraron que todos ellos resultaron negativos.

### **CONCLUSIÓN**

Se concluye que el RVP permanece al menos por 28 días en animales infectados. Se observó un marcaje de inmunoreactividad muy evidente a través de la inmunohistoquímica en el riñón en todos los animales que tenían siete días de infección. En pulmón se evidenció un engrosamiento de la pared alveolar con una infiltración linfocitaria a 14 y 28 dpi. La respuesta de tipo humoral se presentó a partir de los 7 dpi detectando anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación en todos los animales infectados.

### **REFERENCIAS**

1. Hernández et al., 1998; *Vet. Immunol. Immunopath.* 64: p. 367-381.
2. Ramírez, M.H. 1998, *Tesis de Doctorado, FMVZ-UNAM. México.*
3. Vallejo et al., 2000; *Comp Biochem and Physiol B* 126: 415-424.
4. Hjertner et al., 1997; *Acta Vet. Scand.* 38: 213-224.
5. McNeilly et al., 1997; *J. Vet. Diagn. Invest.* 9: 3-9.

Proyecto financiado por PAPIIT IN 208814-3.