

**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**  
**FACULTAT DE VETERINÀRIA**  
**DEPARTAMENT DE PATOLOGIA Y PRODUCCIÓ ANIMALS**

**SÍNDROME RESPIRATORIO Y REPRODUCTIVO  
PORCINO: INTERACCIÓN CON EL AGENTE CAUSAL  
DE LA ENFERMEDAD DE GLÄSSER**

**Joaquim Segalés i Coma**

**Memoria presentada para optar al  
grado de Doctor en Veterinaria**

**Bellaterra, Junio de 1996**

Universitat Autònoma de Barcelona  
Servei de Biblioteques

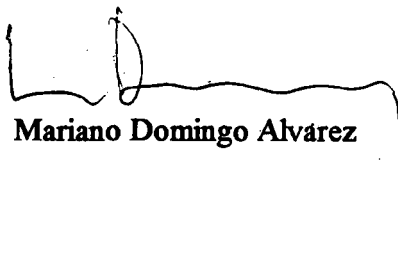


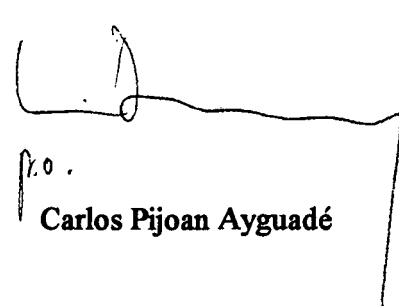
1500491771

Don Mariano Domingo Alvarez, catedrático del Departamente de Patologia i Producció Animals de la Universidad Autónoma de Barcelona, y Don Carlos Pijoan Ayguadé, Professor del College of Veterinary Medicine de la Universidad de Minnesota (Estados Unidos),

**CERTIFICAN:** que la tesis doctoral que tiene por título **SÍNDROME RESPIRATORIO Y REPRODUCTIVO PORCINO: INTERACCIÓN CON EL AGENTE CAUSAL DE LA ENFERMEDAD DE GLÄSSER**, de la que es autor el licenciado en Veterinaria Don Joaquim Segalés i Coma, se ha realizado entre la Unidad Docente de Histología y Anatomía Patológica de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona y el Clinical and Population Sciences Department del College of Veterinary Medicine de la Universidad de Minnesota bajo nuestra dirección.

Y para que conste, a todos los efectos, firmamos la presente en Bellaterra, a 5 de Junio de 1996.

  
Mariano Domingo Alvarez

  
Carlos Pijoan Ayguadé



Facultat de Veterinària

Date	- 6 JUNY 1996
Entrada num.	105
Sortida num.	466

# ÍNDICE

<b>Objetivos.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Capítulo 1: Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS)</b>	
1.1 Introducción.....	2
1.2 Historia y distribución geográfica.....	2
1.3 Agente etiológico.....	5
1.4 Epidemiología.....	7
1.4.1 Incidencia y prevalencia.....	7
1.4.2 Transmisión de la enfermedad.....	9
1.4.3 Factores de riesgo.....	11
1.5 Síntomas clínicos.....	12
1.5.1 Enfermedad aguda.....	13
1.5.2 Enfermedad crónica.....	15
1.5.3 Enfermedad subclínica.....	15
1.6 Lesiones.....	16
1.6.1 Pulmón.....	16
1.6.2 Ganglios linfáticos.....	18
1.6.3 Mucosa nasal.....	18
1.6.4 Encéfalo.....	19
1.6.5 Corazón.....	19
1.6.6 Vasos sanguíneos.....	20
1.6.7 Tejido conjuntivo.....	20
1.6.8 Placenta y endometrio.....	20
1.6.9 Otros órganos.....	21
1.7 Patología clínica.....	21
1.8 Patogenia.....	22
1.8.1 Patogenia del PRRS en cerdas gestantes.....	22
1.8.2 Patogenia del PRRS en verracos.....	28
1.8.3 Patogenia del PRRS en su forma respiratoria.....	29
1.8.4 Modelo de patogenia propuesto para el PRRS.....	33
1.9 Diagnóstico.....	33
1.9.1 Síntomas clínicos.....	35
1.9.2 Lesiones histopatológicas.....	35
1.9.3 Detección del antígeno.....	36
1.9.4 Detección de anticuerpos.....	37
1.10 Diagnóstico diferencial.....	39
1.11 Inmunidad.....	40
1.11.1 Inmunidad humoral.....	41
1.11.2 Inmunidad celular.....	43
1.11.3 Inmunosupresión - Inmunomodulación.....	44
1.12 Tratamiento y prevención.....	45
1.13 Bibliografía.....	47

## **2. Capítulo 2: Infección por *Haemophilus parasuis***

2.1 Introducción e historia.....	60
2.2 Agente etiológico.....	62
2.3 Epidemiología.....	64
2.4 Formas clínicas.....	68
2.4.1 Poliserositis fibrinosa o enfermedad de Glässer.....	68
2.4.2 Septicemia sin lesiones de poliserositis.....	70
2.4.3 Miositis aguda de músculos maseteros.....	70
2.4.4 Alteraciones respiratorias.....	70
2.5 Lesiones.....	70
2.5.1 Pulmón y pleura.....	71
2.5.2 Corazón y pericardio.....	72
2.5.3 Hígado, bazo, estómago, intestinos y mesenterio.....	72
2.5.4 Articulaciones.....	73
2.5.5 Cerebro y meninges.....	73
2.5.6 Riñón.....	74
2.5.7 Otros órganos.....	74
2.6 Patogenicidad y patogenia.....	74
2.7 Diagnóstico.....	78
2.7.1 Historia clínica, síntomas y lesiones.....	79
2.7.2 Detección del antígeno.....	79
2.7.3 Detección de anticuerpos.....	81
2.8 Diagnóstico diferencial.....	82
2.9 Inmunidad y protección.....	83
2.10 Tratamiento y prevención.....	85
2.11 Bibliografía.....	87

## **3. Capítulo 3: Interacción vírico-bacteriana en enfermedades respiratorias del cerdo**

3.1 Introducción.....	93
3.2 Mecanismos de defensa del aparato respiratorio.....	94
3.2.1 Mecanismos de defensa inespecíficos.....	94
3.2.2 Mecanismos de defensa específicos o inmunológicos.....	96
3.3 Conceptos generales de patogenia de la interacción vírico-bacteriana.....	97
3.4 Infección bacteriana asociada a enfermedad respiratoria vírica en el cerdo.....	100
3.5 Infecciones secundarias asociadas al PRRS.....	104
3.6 Bibliografía.....	106

**4. Capítulo 4: Asociación *in vivo* entre el virus del PRRS y *Haemophilus parasuis***

4.1 Introducción..... 111

4.2 Material y métodos..... 112

    4.2.1 Modelo experimental *in vivo* de asociación entre PRRSv y *H. parasuis* en cerdos convencionales libres de PRRS (Experimento 1)..... 112

    4.2.2 Modelo experimental *in vivo* de reproducción de la infección por *H. parasuis* en cerdos convencionales libres de PRRS (Experimento 2). 115

    4.2.3 Modelo experimental *in vivo* de asociación entre PRRSv y *H. parasuis* en cerdos convencionales libres de PRRS y *H. parasuis* (Experimento 3)117

4.3 Resultados..... 120

    4.3.1 Modelo experimental *in vivo* de asociación entre PRRSv y *H. parasuis* en cerdos convencionales libres de PRRS (Experimento 1)..... 120

    4.3.2 Modelo experimental *in vivo* de reproducción de la infección por *H. parasuis* en cerdos convencionales libres de PRRS (Experimento 2). 124

    4.3.3 Modelo experimental *in vivo* de asociación entre PRRSv y *H. parasuis* en cerdos convencionales libres de PRRS y *H. parasuis* (Experimento 3)127

4.4 Discusión..... 151

    4.4.1 Resumen..... 159

    4.4.2 Adendum..... 160

4.5 Bibliografía..... 161

**5. Capítulo 5: Estudio ultraestructural de macrófagos alveolares porcinos (PAM) infectados *in vitro* con PRRSv y dualmente con PRRSv y *Hemophilus parasuis***

5.1 Introducción..... 166

5.2 Material y métodos..... 167

5.3 Resultados..... 172

    5.3.1 Características ultraestructurales de PAM infectados *in vitro* con PRRSv..... 172

    5.3.2 Características ultraestructurales de PAM infectados *in vitro* con PRRSv y *H. parasuis*..... 175

5.4 Discusión..... 184

5.5 Bibliografía..... 190

**6. Capítulo 6: Estudio funcional de macrófagos alveolares porcinos (PAM) infectados dualmente con PRRSv y *Haemophilus parasuis***

6.1 Introducción.....	195
6.2 Material y métodos.....	195
6.3 Resultados.....	198
6.3.1 Lavado broncoalveolar.....	198
6.3.2 Inmunofluorescencia indirecta (IFA) para la detección de PRRSv..	198
6.3.3 Test de fagocitosis.....	198
6.3.4 Test de muerte intracelular.....	199
6.4 Discusión.....	209
6.5 Bibliografía.....	217

**7. Capítulo 7: Conclusiones**

Conclusiones.....	222
-------------------	-----

## OBJETIVOS

El objetivo global del trabajo, que ha sido realizado en colaboración con la Dra. Gloria I. Solano (Universidad de Minnesota, St. Paul, MN, Estados Unidos), ha sido determinar la posible interacción entre el virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRSv) y la bacteria *Haemophilus parasuis*, y caracterizar tanto *in vivo* como *in vitro* la patogenia de la asociación entre estos dos microorganismos.

Dentro de este marco o hipótesis general, en la presente tesis se han estudiado los siguientes objetivos concretos:

1. Determinar la existencia o no de interacción entre el PRRSv y *H. parasuis* en condiciones experimentales *in vivo*.
2. Estudio patológico e inmunohistológico de los animales infectados con los mencionados agentes infecciosos.
3. Estudio de los cambios ultraestructurales sufridos por los macrófagos alveolares porcinos infectados *in vitro* con el PRRSv y dualmente con el PRRSv y *H. parasuis*.
4. Estudio de la capacidad fagocítica y de muerte intracelular de los macrófagos alveolares porcinos infectados *in vitro* con el PRRSv y dualmente con el PRRSv y *H. parasuis*.

**CAPÍTULO 1:**

**SÍNDROME RESPIRATORIO Y  
REPRODUCTIVO PORCINO**



## **1.1 INTRODUCCIÓN**

El Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS) es una enfermedad del ganado porcino que fué descrita como entidad clínica a finales de los años 80 (Dial et al., 1989; Keffaber, 1989; Dial et al., 1990; Loula, 1991). Inicialmente estuvo confinada a los Estados Unidos, pero actualmente es una enfermedad de distribución geográfica muy extensa.

Los brotes epizooticos agudos de PRRS se caracterizan por alteraciones reproductivas, especialmente visibles en la fase final de gestación y maternidades, y alteraciones respiratorias en cerdos de maternidad, transición y engorde (Loula, 1991; Collins et al., 1991; Wensvoort et al., 1991). La manifestación crónica de la enfermedad incluye, como rasgo característico, una elevada prevalencia de enfermedades secundarias en transición y engorde (Christianson y Joo, 1994; Pijoan et al., 1994). Se ha descrito una forma subclínica de la infección, en la cual no se observan manifestaciones clínicas (Christianson y Joo, 1994).

En los últimos años han sido publicados varios artículos de revisión de la enfermedad y su diagnóstico (Goyal, 1993; Christianson y Joo, 1994; Mengeling et al., 1995). El objetivo de la presente revisión bibliográfica es presentar el PRRS de una forma global, haciendo hincapié en los aspectos que puedan ser más relevantes para los estudios incluidos en esta tesis: lesiones, patogenia e inmunidad de la enfermedad.

## **1.2 HISTORIA Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DEL PRRS**

Durante el período de 1987 a 1991 el PRRS permaneció como una enfermedad "misteriosa" por el hecho de no conocerse el agente causal que la provocaba (Enfermedad Misteriosa del Cerdo). No obstante, esta denominación fue muy variada según países y zonas geográficas. Los siguientes nombres fueron aplicados a lo que actualmente conocemos como PRRS:

- \* Plaga 1988-1989 (Estados Unidos)
- \* Enfermedad '89 (Estados Unidos)

- \* Síndrome de Fallo Reproductivo (Estados Unidos)
- \* Síndrome Respiratorio y de Infertilidad Porcino (SIRS) (Estados Unidos)
- \* Síndrome HAAT (síndrome de hipertermia, abortos tardíos, anorexia y pérdidas neonatales) (Canadá)
- \* Aborto Infeccioso Tardío de las Cerdas (Alemania)
- \* Aborto Azul (Holanda)
- \* Síndrome Respiratorio y de Aborto Epidémico Porcino (PEARS) (Holanda)
- \* Enfermedad Azul del Cerdo (Francia)
- \* Síndrome Disgénésico y Respiratorio del Cerdo (Francia)
- \* Enfermedad de la Oreja Azul (Reino Unido)
- \* Nueva Enfermedad del Cerdo (Comisión Europea)
- \* Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS) (Comisión Europea)

En Mayo de 1992 la Oficina Internacional de Epizootias (OIE), a raíz del I International Symposium on Swine Infertility and Respiratory Syndrome (St. Paul, MN, Estados Unidos), acordó adoptar el término PRRS como denominación general de la enfermedad, y ésta fué incluida en la lista B del Código Zoonosario Internacional (enfermedades de las cuales hay que realizar un informe anual para la OIE).

A consecuencia de este hecho, los países que declararon la enfermedad sufrieron una restricción de movimiento internacional de ganado y semen porcino. Debido a esta repercusión negativa, es un hecho ampliamente conocido que algunos países con el PRRS diagnosticado no procedieron a su declaración oficial (Meredith, 1994).

La etiología del PRRS fué dada a conocer en 1991 (Wensvoort et al., 1991) y confirmada posteriormente por diversos autores (Collins et al., 1992; Plana-Duran et al., 1992). Anteriormente habían sido propuestos como posibles etiologías del síndrome: parvovirus porcino (PPV), virus de la encefalomiocarditis (EMCV), enterovirus porcinos (PEV), virus de Aujeszky (ADV), citomegalovirus porcino, virus de la encefalomielitis hemaglutinante (HEV), virus de la Influenza porcina (SIV), virus de la gastroenteritis transmisible (TGEV), virus de la diarrea viral bovina (BVDV), virus de la Border Disease, virus de la encefalitis japonesa B, virus de la peste porcina

clásica (HCV), *Leptospira interrogans* serovar *bratislava*, *Chlamydia psittaci* y micotoxinas (Keffaber, 1989; Bane y Hall, 1990; Bolin y Cussels, 1990; Mengeling y Lager, 1990; Van Alstine, 1990; Woollen et al., 1990).

La primera descripción clínica del PRRS fué realizada en el estado de Iowa (Estados Unidos) en 1987, pero estudios serológicos retrospectivos han demostrado la presencia de anticuerpos anti-PRRS en sueros correspondientes a animales sangrados en 1985 (Owen et al., 1992). Los estudios epidemiológicos llevados a cabo en Estados Unidos en 1992 mostraron que la infección estaba presente al menos en 19 estados, observándose prevalencias de entre el 20 y 83% (Morrison et al., 1992).

En Canadá la enfermedad fue detectada en otoño de 1987 (Sanford, 1992; Voicú et al., 1992; Dea et al., 1992). Los síntomas observados fueron, básicamente, hipertermia, anorexia, abortos tardíos y pérdidas neonatales, que supusieron la denominación de la enfermedad como Síndrome HAAT (iniciales de los síntomas observados).

La enfermedad se extendió en Europa en el invierno de 1990-1991, detectándose inicialmente en Alemania (Lindhaus y Lindhaus, 1991) y Holanda (Wensvoort et al., 1991). Posteriormente siguieron brotes confirmados en España (Enero 1991) (Plana-Durán et al., 1992), Bélgica (Abril 1991) (Meredith, 1991), Reino Unido (Junio 1991) (Meldrum, 1992), Francia (invierno 1991-1992) (Baron et al., 1992), Dinamarca (Enero 1992), Malta (Febrero 1992), Italia, Polonia, Luxemburgo y Austria (Octubre 1992) y Suiza (Noviembre 1992). En Rusia también hubo la sospecha no confirmada de PRRS en 1991, pero todos los animales sospechosos fueron sacrificados (Meredith, 1992).

También se reconoce la presencia de la enfermedad en muchos otros países, como Chile, Brasil, México (Correa-Girón et al. 1994), Filipinas, Japón y Corea del Sur, por lo cual, dada su vasta localización, no es arriesgado el hecho de considerar al PRRS, actualmente, como una enfermedad de distribución mundial (Meredith, 1994).

### 1.3 AGENTE ETIOLÓGICO

El virus del PRRS (PRRSv) es un virus pleomórfico, aunque predominantemente esférico, con envoltura, y de un diámetro variable de 45 a 80 nm, con una nucleocápside cúbica de 25 a 35 nm de diámetro (Ohlinger et al., 1991; Benfield et al., 1992a; Wensvoort et al., 1992a; Christianson y Joo, 1994; Mardassi et al., 1994a). Su densidad es de 1.18-1.20 g/ml en gradiente de cloruro de cesio (Benfield et al., 1992a; Wensvoort et al., 1992a; Mardassi et al., 1994a), de 1.14 g/ml en gradiente de sucrosa (Ohlinger et al., 1991; Wensvoort et al., 1992a) y de 1.19 g/ml en gradiente de glicerol-tartrato (Wensvoort et al., 1992a).

Se trata de un virus relacionado físico-química y estructuralmente con los representantes de la familia *Togaviridae*: virus de la Arteritis Viral Equina (EAV), del género *Arterivirus*, y virus de la Lactato-Deshidrogenasa (LDV) de los ratones y virus de la Fiebre Hemorrágica de los Simios (SHFV), incluidos como *Togavirus* pero sin clasificación de género (Fenner et al., 1987). Este hecho ha sugerido la re-clasificación de todos estos virus en la que sería la nueva familia *Arteriviridae* (Plagemann y Moenning, 1992; Meulenberg et al., 1993b; Meulenberg et al., 1994).

Actualmente existen dos cepas de referencia del PRRSv; una de ellas es la cepa americana que recibió el nombre de aislamiento ATCC VR-2332 (Minnesota Veterinary Diagnostic Laboratory, St. Paul, MN, Estados Unidos) (Collins et al. 1992) y la otra es la cepa europea denominada virus de Lelystad (Central Veterinary Institute, Lelystad, Holanda) (Wensvoort et al. 1991).

El genoma del PRRSv consta de una molécula simple de RNA poliadenilada. La hibridación con clones de DNA complementario mostró una secuencia de 15,088 nucleótidos (15.1 kb) (Meulenberg et al., 1993a). Se han identificado hasta ocho fases de lectura abierta (ORFs) que codifican para las distintas proteínas víricas. Los ORF 1a y ORF 1b codifican por las subunidades de la RNA polimerasa y se trata de unas secuencias víricas muy conservadas (Meulenberg et al., 1993a; Conzelmann et al., 1993). Probablemente los ORFs 2 a 6 codifiquen proteínas asociadas a membrana (proteínas M) y el ORF 7 codifique una proteína de la nucleocápside (proteína N) (Meulenberg et al., 1993b; Meng et al., 1994). Por su parte, el ORF 7 codifica una proteína de 15 kD, el ORF 6 una proteína de 19 kD, el ORF 5 una de 24.5 kD (Mardassi et al., 1994b) y el ORF 3

una de 26 kD (Katz et al., 1994). De los ORFs 2 y 4 aún no se conoce exactamente su producto de traducción. Gran parte de la variabilidad entre cepas del PRRSv se sitúa en la secuencia de aminoácidos de los productos de ORF 6 y 7, demostrando una identidad de 96-100% entre distintos aislamientos americanos para las dos proteínas que codifican, mientras que si se comparan la cepa de referencia americana con distintos aislamientos europeos, el grado de homología es del 57-59% para la proteína M (ORF 6) y del 78-81% para la proteína N (ORF 7) (Meng et al., 1994).

El PRRSv es estable al menos durante 10 semanas a  $-70^{\circ}\text{C}$  y  $-20^{\circ}\text{C}$ . Después de 6 meses a estas temperaturas, hay una pérdida de 1 log de  $\text{TCID}_{50}$ . Se produce una pérdida de 5 log de  $\text{TCID}_{50}$  del título inicial a las 13 semanas a  $4^{\circ}\text{C}$ , 2 semanas a  $21^{\circ}\text{C}$  y 2 días a  $37^{\circ}\text{C}$ . La pérdida es de 3 log de  $\text{TCID}_{50}$  en 1 hora a  $56^{\circ}\text{C}$ . Su estabilidad óptima se sitúa en valores de pH de 6.25 a  $4^{\circ}\text{C}$  y de pH de 6.00 a  $37^{\circ}\text{C}$ . No obstante, teniendo en cuenta la curva de crecimiento del virus y su estabilidad a la temperatura y pH, se considera que el virus tiene poca estabilidad bajo las condiciones de propagación ordinarias ( $37^{\circ}\text{C}$  a pH de 7.5) (Bloemraad et al., 1994).

El PRRSv no es hemaglutinante; resultó negativo en cuanto a hemaglutinación de eritrocitos de cerdo, oveja, cabra, vaca, rata, ratón, conejo, cobaya, humano tipo O, pato y gallina (Benfield et al., 1992a; Wensvoort et al., 1992a; Yoon et al., 1992a).

El crecimiento del virus en título entre  $10^5$  y  $10^7$   $\text{TCID}_{50}$  puede ser soportado por 3 tipos celulares:

- \* macrófagos alveolares porcinos (PAMs) primarios (Wensvoort et al., 1991)
- \* línea celular continua CL 2621 (Benfield et al., 1992a)
- \* línea celular MA 104 (concretamente la subpoblación MARC 145, considerada un clon celular de la línea MA 104 altamente permisivo para la replicación de PRRSv) (Kim et al., 1993)

El virus produce un efecto citopático en PAMs en 1-4 días, consistente en rugosidad, agrupación y lisis celular. En las líneas CL 2621 y MA 104 el efecto citopático es equivalente al observado en PAMs pero se desarrolla más lentamente (2-6 días) (Benfield et al., 1992a; Kim et al., 1993). Otro factor a tener en cuenta es el hecho de que aunque los PAMs sean algo más sensibles para el aislamiento vírico que las líneas celulares, algunos aislamientos de PRRSv solo se replican en una de

las líneas celulares y algunos otros solo en PAMs, amén de que ciertos aislamientos si se replican en uno y/u otro medio celular pero no obstante no producen efecto citopático (Bautista et al., 1993).

## **1.4 EPIDEMIOLOGÍA**

Debido a que la disponibilidad de tests de diagnóstico totalmente fiables es muy reciente (hasta finales de 1992 no se aplicaron de forma rutinaria los tests de diagnóstico), el número de publicaciones que hacen referencia a aspectos epidemiológicos del PRRS es relativamente bajo (Christianson, 1993).

La mayoría de artículos y comunicaciones existentes hasta el momento se basan, por lo general, en evidencia circunstancial de la enfermedad y en la mayoría de casos ha habido muchas confusiones debido a infecciones subclínicas de PRRS en granjas donde el problema estaba teóricamente controlado. A pesar de ello, es posible lograr un conocimiento general sobre la incidencia y prevalencia, transmisión y factores de riesgo asociados a la infección por el PRRSv.

### **1.4.1 Incidencia y prevalencia**

La primera notificación de un brote epizootico de PRRS se realizó en el año 1987. No obstante, el primer caso de positividad frente a este virus data del año 1985 en el estado de Iowa y en 1986 en el estado de Minnesota (ambos en Estados Unidos). La prevalencia de la enfermedad clínica se incrementó muy rápidamente en los años 1988 y 1989, y los resultados de un estudio serológico retrospectivo de aquellos animales realizado a través de la prueba de inmunofluorescencia (IFA) da una idea de este fenómeno (Zimmerman et al., 1993). En la Tabla 1 se muestran los datos referidos a un estudio en granjas del estado de Iowa entre 1980 y 1989.

**Tabla 1.** Aumento de la prevalencia de animales seropositivos al PRRSv entre los años 1980 y 1989 experimentado en granjas del estado de Iowa (Estados Unidos).

<b>AÑO</b>	<b>% ANIMALES POSITIVOS</b>
<b>1980</b>	<b>0 %</b>
<b>1985</b>	<b>9.6 %</b>
<b>1986</b>	<b>20.8 %</b>
<b>1987</b>	<b>32.4 %</b>
<b>1988</b>	<b>47.6 %</b>
<b>1989</b>	<b>51.7 %</b>

Con estos datos, parece claro que el virus tuvo su aparición en la cabaña porcina americana en algún momento entre los años 1980 y 1985, y se extendió con gran rapidez. Estudios más extensos de la seroprevalencia realizados en Estados Unidos (Morrison et al. 1992), en un muestreo aleatorio en 11 estados, reflejaron los siguientes niveles (pruebas realizadas con la técnica de IFA (Yoon et al. 1992b)):

Michigan.....	82%
Iowa.....	65%
Ohio.....	50%
Minnesota.....	41%
Illinois.....	39%
Indiana.....	38%
Nebraska.....	29%
North Carolina.....	25%
Oregon.....	negativo
Pennsylvania.....	negativo
Tennessee.....	negativo

En Europa no se dispone de datos sobre la prevalencia de PRRS, pero se ha observado que el número de brotes epizooticos ha disminuido considerablemente después de los brotes de 1991 y 1992. Al igual que en Estados Unidos, el hecho de observar un menor nivel de enfermedad clínica se puede deber a una disminución de la virulencia del virus o a una cronificación de la enfermedad. Lo que si se ha podido comprobar es que la mayoría de granjas infectadas con el PRRSv, tanto en

Europa como en Estados Unidos, se mantienen persistentemente infectadas. Tres factores pueden contribuir a este fenómeno (Christianson, 1993):

\* Algunas cerdas podrían escapar a la infección epizootica inicialmente y se podrían infectar meses más tarde y dar lugar a lechones virémicos. Estos lechones serían los que diseminarian el virus hacia cerdos sanos y, por tanto, mantendrían la infección. Además, se ha descrito que la inmunidad de la infección natural no es de por vida, y una misma cerda podría volver a infectarse y mantener este ciclo.

\* Los cerdos de engorde podrían actuar como reservorios del PRRSv e infectar cerdos recientemente destetados que han perdido o están perdiendo la inmunidad materna. Se han descrito viremias de hasta 4 semanas en cerdos de engorde, de manera que el período de excreción del virus tiene que ser más elevado aún. De esta manera, en el mismo momento en que la seroprevalencia positiva está en decremento en parideras y gestación, en el engorde puede haber una continua infección y seroconversión.

\* Periódicamente podrían ser introducidas en la granja primerizas seronegativas susceptibles a la infección como animales de reposición, de manera que la cadena de excreción vírica es suficiente como para que se puedan infectar estos animales al llegar a la granja a partir de otras cerdas o lechones virémicos.

Algunos autores señalan al segundo factor como el principal en la persistencia de la infección en la granja. En un elevado porcentaje de casos, la recirculación vírica en transición es uno de los principales factores que contribuyen a la persistencia del PRRSv en granjas (Christianson y Joo, 1994).

#### **1.4.2 Transmisión de la enfermedad**

Los casos mejor documentados sobre la transmisión del PRRSv son aquellos en que, en algún momento, ha habido alguna introducción de cerdos infectados dentro de una granja susceptible (Christianson y Joo, 1994). Hasta el momento se ha demostrado que puede haber infección por contacto entre animales después de 2, 4, 6, 8 y 14 semanas post-infección (PI) de uno de ellos. El



virus se ha podido aislar de hisopos nasales, hisopos fecales y orina de cerdos infectados, de manera que la vía respiratoria, heces y orina son vías de importancia en cuanto a la excreción vírica.

No obstante, también se ha documentado la posible transmisión del virus por el aire. Este tipo de transmisión ha sido defendido especialmente en Europa y, aunque es difícil la demostración definitiva de este hecho, hay evidencia circunstancial de que es real. En el Reino Unido se estableció una especie de escala para poder demostrar que este tipo de transmisión ocurre (Robertson, 1991). El estudio incluyó, según la distancia respecto la granja infectada, el porcentaje de granjas de alrededor que se infectaban:

- \* a <1 km. de la granja infectada: 57% de las granjas se infectan
- \* a 1-2 km. de la granja infectada: 31% de las granjas se infectan
- \* a 2-3 km. de la granja infectada: 11% de las granjas se infectan
- \* a >3 km. de la granja infectada: las granjas se mantienen negativas

Aunque estos datos no son aplicables en general, dado que dependen mucho de las condiciones climatológicas, ambientales, etc... de cada región, si dan una idea de que pensar en transmisión aerógena del PRRSv si tiene sentido. En Dinamarca se ha sugerido que podría haber transmisión por este sistema hasta 20 km de distancia. No obstante, estos son datos no comprobados y la evidencia más reciente demuestra la dificultad de transmitir la enfermedad entre cerdos separados solo por 40 cm. de distancia dentro de una misma sala (Zimmerman, 1995).

Otra de las vías de transmisión investigadas es a través del semen. Se ha demostrado que el semen total (sin diluir) de un verraco infectado puede ser infeccioso (capaz de reproducir la enfermedad en animales inoculados intraperitonealmente) hasta 43 días PI (Swenson et al., 1994a) y que, por pruebas de PCR, se puede llegar a encontrar virus hasta 92 días PI (incluyendo excreción vírica por semen entre 3 y 9 días antes de que el animal haya seroconvertido) (Christopher-Hennings et al., 1994b). Igualmente, se demostró que la introducción de semen total recogido de un verraco recientemente infectado en el útero de una cerda susceptible, causaba en ella la infección (Yaeger et al., 1993), mientras que esto no ocurría si el semen era diluido para su uso en inseminación artificial (Swenson et al., 1994b). Contrariamente a este punto, no obstante, se ha descrito que el virus puede

ser recuperado y ser infectivo hasta seis meses después de congelado en semen diluido para inseminación artificial (Molitor, comunicación personal).

También se ha estudiado la posibilidad de que otras especies animales tengan algo que ver en la cadena de infección del PRRS. Hasta ahora se sabe que algunas especies aviares (gallinas cruzadas con raza Cornish, patos de Mallard, patos Muscovy y gallinas de Guinea) son susceptibles al virus (Zimmerman et al., 1993). Estos animales no desarrollan ningún tipo de sintomatología clínica pero el virus puede ser aislado de heces en distintos periodos PI. También se han realizado infecciones experimentales con rata y ratón, pero se concluyó que no existe susceptibilidad de estas especies a la infección por PRRSv (Hooper et al., 1994).

Resumiendo, pueden establecerse una serie de características de la transmisión del PRRSv (Zimmerman et al., 1994):

- \* el PRRSv es altamente infeccioso para el ganado porcino
- \* los cerdos infectados eliminan virus por heces, orina y secreciones nasales
- \* la transmisión por aerosol puede producirse, pero probablemente en distancias cortas
- \* todo animal comprado en una granja que está infectada con PRRSv ha de ser considerado como fuente de infección
- \* la infección de verracos supone la excreción de virus a través de semen
- \* el PRRSv se inactiva de forma relativamente rápida en un ambiente con ausencia de agua
- \* se desconoce el papel de otras especies en la epidemiología de la infección

#### **1.4.3 Factores de riesgo**

Se consideran básicamente 4 factores de riesgo en cuanto a la extensión de esta enfermedad (Christianson, 1993; Christianson y Joo, 1994):

- \* compra externa de animales
- \* no realizar la cuarentena adecuada a los cerdos adquiridos
- \* excesiva proximidad a granjas infectadas
- \* tamaño muy grande de granja

A pesar de todos los datos que actualmente se conocen sobre la epidemiología del PRRS, estos no son suficientes como para poder establecer perfectamente el patrón de diseminación que ésta ha tenido y predecir su comportamiento futuro. Una de las áreas que puede tener más importancia y a la que no se ha dedicado demasiado esfuerzo, es el estudio de la existencia de animales que actúen como reservorio y que en un momento dado puedan actuar como excretores del virus (portadores asintomáticos excretores).

## 1.5 SÍNTOMAS CLÍNICOS

Desde su aparición, numerosos síntomas clínicos han sido relacionados con el PRRS, aunque muchos de ellos podrían no deberse a este síndrome, sino a la presencia de infecciones secundarias (Loula, 1991; Blaha, 1992; Benfield et al., 1992b; Pijoan et al., 1994).

Esto presupone que a nivel de campo es difícil poder establecer claramente los síntomas clínicos asociados a PRRS, de manera que dividiremos éstos según los observados en infecciones experimentales y los observados aguda y crónicamente a nivel de práctica clínica.

De forma experimental han sido desarrollados distintos modelos de enfermedad según la fase del ciclo de producción:

\* En cerdas a la mitad de la gestación (50-60 días de gestación) infectadas con PRRSv, no se observó más que una ligera fiebre y anorexia transitoria (Christianson et al. 1993). En cerdas infectadas entre 80 y 90 días de gestación (período considerado crítico para la infección con PRRSv), y en diferente medida, se han podido describir síntomas de inapetencia, fiebre, partos prematuros y/o retardados, disminución de la tasa de concepción, abortos y, más raramente, cianosis de orejas, dorso y vulva, y conjuntivitis (Terpstra et al., 1991; Christianson et al., 1992; Plana-Duran et al., 1992a,b; Gorcyca et al., 1993; Stockhofe-Zurwieden et al., 1993; Botner et al., 1994; Lager et al., 1994a; Mengeling et al., 1994).

\* En maternidades se pudo observar un claro aumento de animales nacidos muertos y, en menor medida, un mayor número de animales momificados. Otro síntoma típico es el nacimiento de muchos lechones débiles, de poca viabilidad que suelen morir en elevado porcentaje en la primera semana de vida (Terpstra et al., 1991; Christianson et al., 1992; Plana-Duran et al., 1992b; Stockhofe-Zurwieden et al., 1993; Botner et al., 1994; Mengeling et al., 1994).

\* Los animales de transición, y en mucha menor medida, los animales de engorde pueden mostrar desde prácticamente ningún síntoma hasta fiebre y inapetencia, problemas respiratorios como disnea con hiperpnea y tos, edema periorbicular y escrotal y, también en mucha menor medida, cianosis de orejas y región abdominal (Collins et al., 1990; Pol et al., 1991; Collins et al., 1992; Ramos et al., 1992; Yoon et al., 1992a; Collins y Rossow, 1993; Fichtner et al., 1993; Magar et al., 1993; Halbur et al., 1994; Rossow et al., 1994a; Rossow et al., 1995a).

\* En verracos la infección por PRRSv suele pasar desapercibida, pero se han descrito casos de animales con ligera fiebre y inapetencia y, en algún caso, disminución manifiesta de producción de volumen seminal (Swenson et al., 1994a; Prieto et al., 1994).

En condiciones naturales la infección por PRRSv se ha podido observar en todo tipo de sistemas de producción, sea con animales confinados en edificios o mantenidos en exteriores, en producción intensiva o extensiva, todo tipo de tamaño de granja e independientemente del estado sanitario de las granjas (Keffaber, 1989; Loula, 1991).

Actualmente el PRRS se divide clínicamente en enfermedad aguda, crónica y subclínica (Christianson, 1993):

### **1.5.1 Enfermedad Aguda**

La enfermedad aguda ha sido dividida cronológicamente en tres fases (Raymakers, 1991): inicial, clímax y final.

**FASE INICIAL:** Caracterizada por inapetencia, letargia, depresión e hipertermia. Esta fase se suele iniciar en la zona de cubrición/gestación de la granja, en maternidad o en engorde.

Habitualmente la dispersión del virus a otras áreas de la granja se suele producir rápidamente. Esta fase inicial suele durar entre 1 y 3 semanas. Además de estos síntomas más o menos inespecíficos, y básicamente en Europa, también se han asociado a infección por PRRSv la presencia de cianosis en orejas, vulva, cola, abdomen y hocico. Los síntomas respiratorios pueden o no ser observados, especialmente en cerdos de engorde en esta fase, pero si son bastante acusados en lechones de maternidad. Los abortos en el último tercio de la gestación ocurren infrecuentemente (Loula, 1991; Gordon, 1992; Hopper et al., 1992).

**FASE DE CLÍMAX:** Esta fase se ha descrito como una "tormenta" de partos prematuros, aumento del número de lechones nacidos muertos, de fetos momificados, de lechones nacidos débiles y de mortalidad pre-destete (Van Alstine 1991). Los abortos al final de la gestación se suelen producir entre los días 107 y 113, y en esta fase se ha observado que puede llegar a afectar entre el 5 y el 30% de las cerdas (Loula, 1991; Raymakers, 1991; Hopper et al., 1992). Las camadas pueden tener entre 0 y el 100% de animales nacidos muertos, y el número de momificados (definidos como fetos que se observan edematosos, friables, de un color marronaceo o negros) puede llegar a ser de hasta el 25%. Los cerdos nacidos vivos durante esta fase suelen mostrarse débiles y, frecuentemente, con síntomas de "splay-leg". En estos animales también han sido descritos síntomas como respiración forzada, edema periorbicular, conjuntivitis y diarrea que no responde a antibióticos (Loula, 1991; Ahl et al., 1992; Hooper et al., 1992). Los cerdos de engorde pueden o no manifestar alteraciones respiratorias. No obstante, uno de los efectos más frecuentemente descritos es el incremento de infecciones secundarias en cerdos de engorde, y especialmente en transición. La mayoría de agentes bacterianos y víricos que se han asociado a la infección por PRRSv en esta fase se detallan en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Agentes bacterianos y víricos que han sido asociados a la fase de clímax de la infección por PRRSv (Loula, 1991; Benfield et al., 1992b; Blaha, 1992; Pijoan et al., 1994; Halbur et al., 1995a).

AGENTES BACTERIANOS	AGENTES VÍRICOS
<i>Haemophilus parasuis</i> <i>Streptococcus suis</i> <i>Salmonella cholerae-suis</i> <i>Pasteurella multocida</i> <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	Virus de la Influenza porcina Virus de la Encefalomiocarditis Virus de la Enfermedad de Aujeszky Citomegalovirus Coronavirus Respiratorio porcino Paramixovirus porcino

**FASE FINAL:** Es una fase caracterizada por el retorno de los parámetros reproductivos de la granja a unos niveles próximos a la normalidad previa a la infección por el PRRSv y un nivel variable de enfermedad respiratoria en transición y engorde (Christianson y Joo, 1994).

### 1.5.2 Enfermedad crónica

La enfermedad crónica ha sido mucho menos estudiada que los típicos brotes epizooticos de la enfermedad aguda. Incluso muchos de los estudios presentados sobre esta fase son contradictorios entre si. Parece ser que la mayoría de parámetros reproductivos son aproximadamente normales, pero, a largo plazo, se ha podido denotar cierto grado de disminución en cuanto a número de lechones nacidos vivos y cierta reducción en cuando a número por partos por cerda y año (Dial et al., 1990; Polson et al., 1990; Loula, 1991; Keffaber et al., 1992). No obstante, donde los problemas crónicos asociados al PRRS son mas manifiestos es en fase de transición, debido probablemente a la recirculación del virus; en un estudio incluso se ha podido aislar virus después de 2 años y medio después del brote inicial (Keffaber et al., 1992). La infección persistente en la fase de transición se relaciona con una elevada prevalencia de enfermedades secundarias, especialmente respiratorias (rinitis y neumonías), crecimiento retardado, peores índices de conversión y mayor mortalidad (Loula, 1991; White, 1991). Actualmente no se conocen datos sobre la prevalencia de granjas infectadas crónicamente con PRRS.

### 1.5.3 Enfermedad subclínica

La enfermedad subclínica significa la presencia del PRRSv en la granja, detectado por pruebas serológicas, pero con ausencia de síntomas clínicos asociados directamente a la patología causada por el PRRS (Owen et al., 1992; Cho et al., 1993). No se conoce claramente a que es debido este fenómeno pero la posible existencia de diferencias de virulencia entre distintas cepas víricas (Halbur

et al., 1994a) y las diferencias de estado sanitario entre granjas (Blaha, 1992; Mortensen y Madsen, 1992) podrían ser las razones.

## **1.6 LESIONES**

La mayoría de los autores coinciden en que en caso de infecciones con el PRRSv solamente se observan lesiones visibles macroscópicamente en el pulmón y, en casi todos los casos, éstas son debidas a infecciones secundarias concomitantes (Done et al. 1992). En casos no complicados con otros agentes, la mayoría de autores coinciden que las lesiones sólo son detectables microscópicamente (Paton y Done, 1992; Collins et al., 1992; Rossow et al., 1994a; Rossow et al., 1995a), aunque otros han descrito severas lesiones macroscópicas pulmonares (Halbur et al., 1993; Halbur et al., 1994a).

A continuación se describen las lesiones macro, si las hay, y microscópicas de los distintos órganos afectados por el PRRSv.

### **1.6.1 Pulmón**

Macroscópicamente se considera que las lesiones producidas por el PRRSv son mínimas, pero que puede haber variaciones según cepa infectante, dosis vírica y tipo de animal utilizado.

En estudios realizados con la cepa de referencia americana (VR 2332) en cerdos convencionales, éstos no mostraron ningún tipo de lesión (Collins et al., 1992; Yoon et al., 1992a; Rossow et al., 1994a), aunque un autor ha descrito lesiones intensas de consolidación craneo-ventral y áreas marronáceas (20-40% del pulmón) de atelectasia y edema interlobular multifocal (Halbur et al., 1993).

Experimentos realizados con animales gnotobióticos han mostrado resultados variables, apareciendo desde un cambio de color no consistente que desaparecía al perfundir los pulmones (Rossow et al., 1995a) hasta masivos cambios de color y consistencia pulmonares (Halbur et al., 1993).

Estudios realizados con distintas cepas europeas revelan ausencia de lesiones o ligeras áreas de consolidación que se distribuían como un patrón de “parcheado” por toda la superficie pulmonar (Pol et al, 1991; Plana-Duran et al, 1992a; Ramos et al, 1992).

Microscópicamente no se han señalado diferencias importantes entre los distintos aislamientos americanos o europeos. Se coincide que la lesión típica del PRRS es una neumonía intersticial, caracterizada por un aumento de grosor de los tabiques interalveolares debido al aumento del número de macrófagos intersticiales, degeneración de células del epitelio alveolar y presencia de residuos necróticos en alveolos, frecuentemente acompañados por PMNN (Collins et al, 1990; Pol et al, 1991; Collins et al, 1992; Yoon et al, 1992a; Plana-Duran et al, 1992a; Halbur et al, 1993; Rossow et al, 1994a; Halbur et al, 1994a; Rossow et al, 1995a). Estas lesiones pueden también acompañarse de hiperplasia y proliferación de neumocitos tipo II (Collins et al, 1993; Halbur et al, 1993; Rossow et al, 1994a; Rossow et al, 1995a), presencia de manguitos perivasculares y peribronquiales (Rossow et al, 1994a) y presencia de células sincitiales (Halbur et al, 1993; Rossow et al, 1994a; Rossow et al, 1995a).

La intensidad de la lesión pulmonar se relaciona con la edad del animal (mayor intensidad en animales jóvenes) (Rossow et al, 1994a), llegándose incluso a describirse, aunque de forma muy leve, en cerdas adultas (Stockhofe-Zurwieden et al, 1993). La presencia de neumonía intersticial ha podido ser detectada tan precozmente como a los 3 días PI (Rossow et al, 1995). Esta lesión evoluciona y adquiere su mayor intensidad entre los 14 y 28 días PI (Rossow et al, 1995) y a los 35 días PI ya se encuentra en fase de resolución (Halbur et al, 1993). Se considera, además, que se pueden observar sincitios desde los 5 días PI y manifiesto engrosamiento de tabiques alveolares desde el día 7 PI (Rossow et al, 1995).

Ultraestructuralmente se reveló la presencia de células epiteliales bronquiolares vacuolizadas (Pol et al, 1991) y presencia de células degeneradas y necróticas en el infiltrado intersticial (neutrófilos, células plasmáticas y neumocitos tipo II), con hiperplasia de neumocitos tipo II (Ramos et al, 1992).



### **1.6.2 Ganglios linfáticos**

La mayoría de lesiones asociadas a ganglios linfáticos han sido descritas en animales infectados con cepas víricas americanas.

Macroscópicamente se ha descrito el aumento de tamaño de hasta 3 y 4 veces el tamaño normal de una gran cantidad de ganglios linfáticos: mandibular, retrofaríngeo, traqueobronquial, iliaco, inguinal superficial, mediastínico, mesentéricos y poplíteos (Rossow et al., 1994b, 1995a). Inusualmente, en un caso de cerdos de 21 días de edad expuestos congénitamente a PRRSv, se pudieron observar numerosos espacios quísticos en córtex y médula de los ganglios linfáticos ilíacos, llenos de un líquido claro (Rossow et al., 1994b). El resto de ganglios linfáticos aumentados de tamaño eran sólidos a la sección.

Microscópicamente se ha descrito una marcada depleción de linfocitos en el ganglio linfático mesentérico de cerdos infectados con la cepa europea de PRRSv (virus Lelystad), observándose linfadenitis purulenta a los 6-8 días PI (Pol et al., 1991). Con la cepa americana de PRRSv se han descrito lesiones en múltiples ganglios linfáticos de cerdos infectados, caracterizadas por hipertrofia e hiperplasia de centros germinales, áreas con linfocitos necróticos, presencia de espacios quísticos y presencia de policariocitos en los espacios quísticos y tejido cortical (Rossow et al., 1994a,b, 1995a). Estas lesiones podían variar en distribución y severidad, y tenían su inicio a los 3 días PI, manteniéndose al menos hasta los 21 días PI (Rossow et al., 1995a).

### **1.6.3 Mucosa nasal**

No se han descrito lesiones macroscópicas asociadas a la mucosa nasal. Microscópicamente, y en infecciones con el virus Lelystad, se ha descrito degeneración del epitelio ciliar, redondeamiento, espongirosis y descamación de capas superficiales de células epiteliales (Pol et al., 1991). Con la cepa americana (VR 2332) se han descrito desde lesiones muy moderadas e inconsistentes, caracterizadas por la presencia de espacios intraepiteliales con algún PMNN en su interior y pequeños focos de linfocitos en la lámina propia (Rossow et al., 1994a; Rossow et al., 1995a) en alguno de los cerdos infectados, hasta rinitis linfoplasmocitarias afectando a todos los lechones de la camada (Collins et al., 1990).

#### 1.6.4 Encéfalo

En encéfalo solo han sido descritas lesiones microscópicas por investigadores que han utilizado la cepa americana del PRRSV (Collins et al., 1990; Collins et al., 1992; Halbur et al., 1994a; Rossow et al., 1994a; Rossow et al., 1995a). Una de las posibles explicaciones de este hecho es que la lesión encefálica suele ser una lesión relativamente tardía, apareciendo como muy pronto a los 7 días PI y en un bajo porcentaje de los animales infectados, y, hasta el momento, no se han realizado estudios de infección secuencial con las cepas europeas que vayan más allá de los 8 días PI, con un solo animal por día de necropsia (Pol et al., 1991).

En los casos citados anteriormente las lesiones nerviosas son definidas como encefalitis mononucleares ligeras y caracterizadas por la presencia de manguitos perivasculares linfocitocíticos en vasos del cerebro, cerebelo y plexo coroideo (Rossow et al., 1995a). Los manguitos perivasculares en cerebro y cerebelo se encontraron predominantemente en la sustancia blanca (Rossow et al., 1994a). Estas lesiones fueron halladas entre los 7 y 28 días PI, afectando variablemente 1 o 2 de 3 animales por grupo según día de necropsia (Rossow et al., 1995a). También se observó mayor intensidad y frecuencia en animales jóvenes (<4 semanas) (Rossow et al., 1994a).

#### 1.6.5 Corazón

Las lesiones en corazón suelen aparecer tardíamente en el curso de la infección. Esta podría ser, nuevamente, la razón por la cual no ha habido descripción de esta lesión en Europa.

Estas lesiones se detectan como muy temprano a los 14 días PI, y se caracterizan por necrosis multifocal de células miocárdicas con focos inflamatorios de células mononucleares en subendocardio y miocardio (Rossow et al., 1995a). A partir de los 21 días PI se observan focos inflamatorios mononucleares en subendocardio, miocardio y áreas perivasculares, constituyéndose una manifiesta miocarditis linfoplasmocitaria multifocal (Collins et al., 1990; Halbur et al., 1993; Rossow et al., 1994a; Rossow et al., 1995a).

### **1.6.6 Vasos sanguíneos**

La arteria Aorta en su porción torácica y numerosas arteriolas y venas de cerdos infectados experimentalmente con PRRSv mostraron focos de células inflamatorias mononucleares en zona subendotelial y áreas perivasculares, siendo lesiones observadas desde los 14 días PI (Rossow et al., 1995a).

También han sido descritas vasculitis mononucleares en cerdos infectados congénitamente con PRRSv. Estas lesiones se caracterizaban por espongirosis de células endoteliales de capilares y venas pulmonares, con la formación, en algunos casos, de trombos secundarios, que con frecuencia contenían depósitos de calcio. También se observó degeneración, necrosis e infiltrados inflamatorios mono y polimorfonucleares en túnica media y adventicia de venas pulmonares. La observación de este tipo de lesiones en lechones de 2 días de vida indica que éstas se iniciaron antes del nacimiento (Goovaerts y Visser, 1992).

### **1.6.7 Tejido conjuntivo**

Ha sido descrito edema del tejido conjuntivo subcutáneo (Pol et al., 1991; Rossow et al., 1995), de grasa peritoneal y perirenal (Pol et al., 1991) y de párpados (Plana-Durán et al., 1992a). En experimentos realizados en Europa también se ha descrito cianosis de orejas en cerdas (Terpstra et al., 1991; Stockhofe-Zurwieden et al., 1993) y, en un solo caso, en zona ventral y caudal en lechones (Plana-Durán et al., 1992a).

### **1.6.8 Placenta y endometrio**

En la mayoría de los casos no se han observado lesiones que afecten al tracto reproductivo. En infecciones experimentales con la cepa americana del PRRSv se ha descrito una ligera miometritis linfoplasmocitaria caracterizada por la presencia de células plasmáticas, linfocitos y macrófagos asociados a pequeñas venas y vasos linfáticos en el miometrio (Christianson et al., 1992).

En Europa, solo en Alemania han sido descritas evidentes lesiones del tracto reproductivo de cerdas infectadas (Stockhofe-Zurwieden et al., 1993). Macroscópicamente se observaron placentas fetales que se separaban de las maternas y presentaban una coloración marrón-verdosa. En algunos casos se observaron placas calcificadas en la superficie uterina. Microscópicamente se observó cierto

edema endometrial, endometritis, placentitis y cambios degenerativos con microseparaciones multifocales del área de contacto materno-fetal.

### **1.6.9 Otros órganos**

Microscópicamente se han descrito lesiones en otros órganos, de forma totalmente esporádica:

**Riñón:** Se ha descrito nefritis intersticial multifocal tan tempranamente como a los 9 días PI (Halbur et al., 1993) o a los 21 días PI (Rossow et al., 1995a). Esta misma lesión ha sido también descrita en cerdas infectadas con PRRSv (Stockhofe-Zurwieden et al., 1993).

**Timo:** Depleción linfoide (Pol et al., 1991).

**Tonsila:** Depleción linfoide (Pol et al., 1991) y tonsilitis con necrosis de linfocitos (Halbur et al., 1995b).

**Bazo:** Esplenitis reactiva y degeneración elipsoide con cariorrexis y vacuolización (Pol et al., 1991).

**Hígado:** Hepatitis portal (Collins et al., 1990).

**Placas de Peyer:** Depleción linfoide (Pol et al., 1991) y presencia de restos celulares y macrófagos con zonas de necrosis (Halbur et al., 1995b).

## **1.7 PATOLOGÍA CLÍNICA**

Pocos son los estudios relacionados con parámetros clínicos asociados al PRRS. Básicamente se han realizado recuentos de células sanguíneas de animales infectados, con especial interés de las variaciones de leucocitos sanguíneos.

Solo un estudio ha mostrado diferencias significativas en recuento de eritrocitos, valor hematocrito, concentración de hemoglobina y recuento de plaquetas entre cerdos infectados por distintos aislamientos víricos correspondientes a la cepa americana (VR 2332). Una característica común a todos estos aislamientos fue la inducción de una anemia no regenerativa entre los 3 y 28 días PI (Halbur et al., 1994a).

Asimismo se ha observado que hay una disminución del número total de leucocitos hacia los 4 días PI y que su valor se recupera sobre los 7 días PI en cerdos de menos de 2 meses de edad (Rossow et al., 1994a). En cerdas infectadas a mitad de la gestación también se ha demostrado este hecho, siendo su valor mínimo de recuento el día 7 PI y alcanzando una recuperación a los 11 días PI (Christianson et al., 1993). La disminución de leucocitos se relaciona con la disminución de linfocitos, neutrófilos y monocitos, con un aumento relativo de los neutrófilos en banda (Rossow et al., 1994a).

Estudios de médula ósea han revelado un moderado incremento de la relación mieloide: eritroide (1.65:1) en cerdos infectados con PRRSv. Esta relación vuelve a la normalidad (1:1) aproximadamente a los 21 días PI (Halbur et al., 1994a).

Hasta el momento no se han realizado estudios evaluando otros parámetros hematológicos o enzimáticos.

## **1.8 PATOGENIA**

Tal como describe el propio nombre de la enfermedad, ésta tiene básicamente 2 componentes. Uno es el reproductivo, que en condiciones de campo se caracteriza por partos prematuros y fetos momificados, lechones nacidos muertos y lechones nacidos vivos pero débiles, y otro es el respiratorio, afectando especialmente a cerdos de maternidad y engorde, y cuya principal característica es el desarrollo de neumonía intersticial.

La forma reproductiva ha sido estudiada en cerdas gestantes de todos los estadios fisiológicos y verracos, y la forma respiratoria principalmente en cerdos de edades comprendidas entre 0 y 70 días (Christianson y Joo, 1994).

### **1.8.1 Patogenia del PRRS en cerdas gestantes**

Desde 1991 muchos investigadores han realizado infecciones experimentales con cerdas gestantes. En éstas, aunque se haya seguido un diseño experimental relativamente parecido, hay una serie de

diferencias básicamente a nivel de cepas o aislamientos víricos, dosis y número de cerdas infectadas (Tabla 3).

**Tabla 3.** Principales experimentos sobre la patogenia de la infección por el PRRSv en cerdas en distintos estadios de la gestación.

AÑO	PRINCIPAL AUTOR	Nº CERDAS	VIA INOC.	CEPA	PASE	DOSIS (TCID <sub>50</sub> /ml)
1991	Terpstra	8	IN	Lelystad	3	10 <sup>5.1</sup>
1992	Christianson	12	IN	VR2332	3	10 <sup>5.3</sup> /10 <sup>3.5</sup>
1992	Plana-Durán	12	IN/IV	Aislamiento Español	4	10 <sup>5.6</sup>
1993	Christianson	17	IN/IF	VR2332	3	10 <sup>5.3</sup>
1993	Lager	11	IF	?	?	?
1993	Stockhofe-Zurwieden	2	IN	?	?	?
1994	Botner	3	IN	111/92	12	10 <sup>5.4</sup>
1994	Lager	33	IN	NADC-8	?	10 <sup>6</sup>
1994	Mengeling	16	IV	VR2332	?	10 <sup>8</sup>

El efecto más estudiado es el producido por el PRRSv en el último tercio de la gestación (Terpstra et al., 1991; Christianson et al., 1992; Plana-Duran et al., 1992a; Stockhofe-Zurwieden et al., 1993; Botner et al., 1994). En la mayoría de casos se realizó una inoculación intranasal y/o intravenosa con dosis vírica variable entre 10<sup>3.5</sup> y 10<sup>5.6</sup> TCID<sub>50</sub>/ml en cerdas entre los 65 y 93 días de gestación.

Como resultado de estas infecciones experimentales, las cerdas desarrollaron síntomas clínicos transitorios como fiebre e inapetencia de duración entre 2 y 9 días, y observables tras 4-7 días PI vírica.

Algunos autores han descrito un incremento de partos prematuros (Christianson et al., 1992; Plana-Durán et al., 1992a), de gestaciones prolongadas (Botner et al., 1994) o ambos (Terpstra et al., 1991).

La mayoría de estas cerdas parieron entre 8 y 15 lechones que fueron clasificados en varias categorías (Tabla 4).

**Tabla 4.** Características clínico-patológicas de lechones nacidos de cerdas infectadas con el PRRSv.

Principal Autor	Mumificados/ Autolíticos	Nacidos muertos	Sanos	Débiles (viables < 1 sem)
Terpstra	32%		47%	21%
Christianson	24%	26%	50%	
Plana-Durán	22%	6%	41%	31%
Stockhofe-Zurwieden	14%		86%	
Botner et al.	8%		92%	

En todos estos experimentos, en un porcentaje variable que osciló entre el 0 y el 100% de los lechones de las camadas, se obtuvieron aislamientos víricos y títulos serológicos positivos al PRRSv (Terpstra et al., 1991; Christianson et al., 1992; Botner et al., 1994). Del grupo de animales clasificados como autolíticos/mumificados no se aisló el virus.

Estos resultados muestran la susceptibilidad de cerdas previamente seronegativas a desarrollar la infección por el PRRSv. La recuperación de virus en los mismos fetos indica asimismo la capacidad de éste para cruzar la placenta (infección trans-placentaria) y provocar una respuesta inmune de los propios fetos. La mayoría de autores, no obstante, están de acuerdo en que la infección por PRRSv no se relaciona prácticamente con ninguna lesión en la placenta; una ligera miometritis (Christianson et al., 1992) y placentitis además de microseparaciones entre placenta fetal y maternal (Stockhofe-Zurwieden et al., 1993) son las únicas lesiones observadas en estos experimentos. Por contra, si hay algunas lesiones manifiestas en lechones nacidos de madres infectadas; concretamente la presencia de neumonía intersticial multifocal de mayor o menor intensidad en animales nacidos vivos (Plana-Durán et al., 1992a; Botner et al., 1994), pero no aparecen lesiones en animales nacidos muertos.

Un segundo efecto, aunque menos estudiado, es el producido por el PRRSv a mitad de gestación. El objetivo de este estudio fue el de conocer la susceptibilidad a la infección transplacentaria y la subsiguiente infección de los fetos.

Se diseñaron dos experimentos: la infección intranasal de cerdas a mitad de gestación y la inoculación en saco amniótico o intramuscular del virus a fetos en la mitad de la gestación (Christianson et al., 1993). Las cerdas inoculadas siguieron un desarrollo normal de la gestación y

en el momento de la necropsia todos los fetos se observaron normales. Solo en una cerda se obtuvieron 2 lechones en los que el aislamiento vírico fue positivo y 2 lechones con serología positiva en otra cerda. Estos estudios muestran que, si bien la infección transplacentaria a la mitad de la gestación puede producirse, esta es infrecuente, dado que solo en 2/8 animales se confirmó la infección por el PRRSv. La infección de algunos fetos por inoculación de virus en saco amniótico y otros vía intramuscular en la misma cerda supuso la infección específica de los fetos inoculados, lográndose aislar el virus de ellos a los 4 y 11 días PI, pero no se infectaron los fetos controles en el mismo útero ni la madre.

Finalmente, se han realizado estudios de patogenia en la forma de una infección secuencial en el tiempo de animales susceptibles a la enfermedad. Con ello se han podido determinar las variaciones del índice de concepción de las cerdas (Lager et al., 1994), la posibilidad de protección homóloga dentro de una misma gestación (Lager et al., 1994a; Lager et al., 1994b), la infección de fetos intrauterinamente a distintas fases de la gestación (Lager et al., 1993) y la infección de cerdas a los 30, 50, 70 y 90 días de gestación (Mengeling et al., 1994).

La cubrición de cerdas y su infección con PRRSv un día post-cubrición denotó índices de concepción a día 30 de la gestación del 63% (sobre 16 animales) y del 83% (sobre 19 animales) en el caso de cerdas infectadas y no infectadas respectivamente. A pesar de la diferencia, ésta no fue estadísticamente significativa (Lager et al., 1994a).

La posibilidad de infección por PRRSv dos veces en la misma gestación no es rara en granjas donde la circulación vírica está presente en naves de gestación. Experimentalmente se pudo observar que (considerando evidencia de infección la detección de antígeno o anticuerpos contra el PRRSv) (Lager et al., 1994a):

- \* cerdas infectadas día 1 gestación: no hubo evidencia de infección en lechones
- \* cerdas infectadas días 1 y 90 gestación: no hubo evidencia de infección en lechones
- \* cerdas infectadas día 30 gestación: evidencia de infección en lechones de 6/7 camadas
- \* cerdas infectadas días 30 y 90 gestación: evidencia de infección en lechones de 5/5 camadas
- \* cerdas infectadas día 90 gestación: evidencia de infección en lechones de 6/6 camadas



\* cerdas control: no evidencia de infección

La infección intrauterina fue realizada en el saco amniótico en embriones de cerdas de 34, 45, 49, 65 y 85 días de gestación (Lager et al., 1993). Se logró aislar el virus en algún lechón en todas las camadas y todos los estadios contemplados, de manera que se pudo concluir que el feto puede soportar replicación vírica en cualquier fase de desarrollo al menos desde los 34 días de gestación. En un solo caso, se logró aislar virus de un feto de los considerados autolíticos/momificados.

También se observó que, aunque la replicación vírica se pueda dar en todas las fases de gestación en los fetos, si había diferencia entre grupos. Los fetos más jóvenes parecen más refractarios a que la replicación vírica les provoque la muerte, comparando con fetos en estado más avanzado de gestación.

La inoculación intravenosa de cerdas a 30, 50, 70 y 90 días de gestación aportó datos variables. Las cerdas infectadas a 30 días de gestación podían llevar una gestación que consideraríamos normal hasta el final del experimento (3, 6 y 9 semanas post-infección) en 3 de 4 casos sin ningún aislamiento vírico positivo de los fetos, pero en uno de los casos se produjo una gran cantidad de fetos momificados. Las cerdas infectadas a 50 y 70 días de gestación presentaron en 1 de 3 casos en cada grupo la presencia de algún lechón con aislamiento positivo. Las cerdas infectadas a 90 días de gestación manifestaron síntomas de PRRS evidentes, con aislamiento del virus en un elevado porcentaje (>50%) de los cerdos no momificados (Mengeling et al., 1994).

A partir de todos los experimentos realizados en cerdas gestantes, se pueden apuntar una serie de conclusiones en cuanto a la patogenia del componente reproductivo de esta enfermedad:

\* Existe infección trans-placentaria del PRRSv (Terpstra et al., 1991; Christianson et al., 1992; Plana-Durán et al., 1992a; Christianson et al., 1993; Stockhofe-Zurwieden et al., 1993; Lager et al., 1994a; Mengeling et al., 1994).

\* Ésta tiene una incidencia mucho mayor cuando las cerdas expuestas al virus se encuentran a 3-5 semanas de la fecha prevista del parto (Mengeling et al., 1994).

\* La infección en cerdas a mitad de gestación parece no ser un riesgo de cara a sufrir enfermedad reproductiva clínica (Christianson et al., 1993; Lager et al., 1994a; Mengeling et al., 1994), aunque si hay evidencia de infección de lechones (aislamiento y serología positiva en alguno de los lechones de alguna camada).

\* La infección en el primer día de gestación no supone ningún riesgo para la infección *in utero*, y produce una inmunidad protectora contra el desafío homólogo a los 90 días de gestación (Lager et al., 1994a).

\* No se ha podido aislar virus de animales momificados, con una sola excepción (Lager et al., 1994a), pero si de una mezcla de tejidos fetales, suero y fluidos corporales de lechones nacidos muertos (Terpstra et al., 1991; Christianson et al., 1992; Botner et al., 1994; Mengeling et al., 1994).

\* Se ha descrito una disminución del índice de concepción en cerdas infectadas con PRRSv en el primer día de gestación, aunque ésta no resultó estadísticamente significativo (Lager et al., 1994a).

\* Los fetos soportan replicación vírica al menos desde los 34 días de gestación (Lager et al., 1993), pero la probabilidad de infección fetal es mucho mayor en estados tardíos de gestación (Christianson et al., 1993; Lager et al., 1993; Mengeling et al., 1994). Un posible mecanismo que explique este hecho podría ser que en estados iniciales de gestación son 6 las capas histológicas que separan sangre fetal de materna, y a medida que avanza la gestación las vasculaturas materno-fetales se acercan hasta asumir posiciones subepiteliales y lograr la invasión del trofoblasto por capilares embrionarios (Christianson et al., 1993; Lager et al., 1993).

\* Las lesiones observadas en placenta y útero por la infección por PRRSv son mínimas (Christianson et al., 1992; Stockhofe-Zurwieden et al., 1993), y en lechones nacidos vivos se destaca solamente neumonía intersticial (Plana-Durán et al., 1992a,b). Los lechones nacidos muertos y momificados no suelen presentar lesiones (Terpstra et al., 1991; Christianson et al., 1992;

Collins et al., 1992; Botner et al., 1994); en un caso se han descrito lesiones pulmonares y, en menor medida, renales, en fetos infectados a mitad de la gestación y sacrificados 2-3 semanas PI (Lager y Ackermann, 1994).

\* Actualmente aún no se conoce como el virus cruza la placenta, infecta los fetos y llega a matarlos. Se ha sugerido que macrófagos infectados con el virus podrían migrar a través de la placenta como mecanismo para que éste llegara a los fetos (Terpstra et al., 1991).

### **1.8.2 Patogenia del PRRS en verracos**

Este apartado hace referencia a la posibilidad de la transmisión y dispersión del virus del PRRS a través del semen como aspecto importante de la fase reproductiva de la enfermedad.

No hay muchos estudios experimentales sobre esta problemática, pero todos ellos confirman que el semen es una fuente de excreción vírica (Yaeger et al., 1993; Swenson et al., 1994a,b), y hay varios casos donde la evidencia epidemiológica confirma este aspecto (Edwards et al., 1992; Yaeger et al., 1993).

Uno de los principales problemas para estos estudios es la posibilidad de realizar el aislamiento vírico adecuadamente, dado que, con frecuencia, factores citotóxicos en semen inhiben el crecimiento de los cultivos celulares (Swenson et al., 1994a). Para resolver esta problemática se han utilizado otras técnicas que aportan mayor sensibilidad como el bioensayo en cerdo de 4-8 semanas (consiste en inocular intraperitonealmente un volumen de semen al lechón y confirmar su seroconversión) (Swenson et al., 1994a,b) y, más recientemente, el desarrollo de métodos de PCR para semen (Christopher-Hennings et al., 1994b).

La excreción de PRRSv en semen es muy variable según verraco, pero se ha observado que puede darse desde los 3 hasta, al menos, los 92 días post-infección (Swenson et al., 1994a; Christopher-Hennings et al., 1994b).

Estudios de transmisión por inseminación artificial (IA) han demostrado la reproducción del cuadro reproductivo en cerdas inseminadas con semen total infectado (Yaeger et al., 1993), mientras que

no se ha logrado con semen diluido (Swenson et al., 1994b). No obstante, estos estudios han sido realizados con un número bajo de animales y sus resultados no han sido claramente contrastados.

La infección por PRRSv en el verraco provoca una disminución de la cantidad de semen producida y un aumento del pH del mismo (Yaeger et al., 1993; Swenson et al., 1994a; Prieto et al., 1994). Tanto de forma experimental (Prieto et al. 1994) como de forma natural (Feitsma et al., 1992) también ha sido descrita una disminución de la calidad del semen.

A pesar de la escasez de trabajos relacionados con el tema, si puede concluirse que:

\* el PRRSv se excreta vía semen (Yaeger et al., 1993; Swenson et al., 1994a,b; Prieto et al., 1994; Christopher-Hennings et al., 1994a).

\* el PRRSv puede ser infectivo en semen (Yaeger et al., 1993; Swenson et al., 1994a, 1994b).

\* el proceso de dilución de semen puede o no destruir el virus, pero probablemente la disminución de la infectividad es debida al simple hecho de la dilución (Ulyshen, 1994).

\* no se han observado lesiones ni macro ni microscópicas en el aparato reproductor de verracos infectados experimentalmente (Yaeger et al., 1993; Swenson et al., 1994b).

No obstante, no se ha podido establecer aún como el virus llega al semen ni si se multiplica en algún punto del aparato reproductor masculino.

### **1.8.3 Patogenia de la forma respiratoria del PRRS**

Se considera que la patogenia del PRRSv está influenciada por muchos factores, entre los cuales hay que destacar edad, sexo, estado inmunitario, cepa vírica y otros (Collins y Rossow, 1993; Collins, 1993). Se han diseñado distintos experimentos con el objeto de establecer la patogenia de esta enfermedad, y aunque en la mayoría se utilizan cerdos susceptibles de cualquier edad inoculados intranasalmente (Tabla 5), la inoculación intramuscular, intravenosa o intraperitoneal también reproduce la enfermedad (Wensvoort et al., 1991; Plana-Duran et al., 1992b; Swenson et al., 1994a, 1994b).

**Tabla 5.** Principales experimentos que reproducen la infección respiratoria asociada al PRRS con inoculación vírica por vía intranasal.

AÑO	PRINCIPAL AUTOR	CEPA VÍRICA (PASE)	DOSIS (TCID <sub>50</sub> /ml)	RUTA	TIPO DE CERDO (Nº CERDOS)
1991	Pol	Lelystad (3)	10 <sup>5</sup>	IN	Gnotobiótico (6)
1992	Collins	VR2332 (3)	10 <sup>5</sup>	IN	Gnotobiótico (4)
1992	Ramos	Huesca 1 (?)	10 <sup>5.6</sup>	IN	Convencional (12)
1992	Yoon	MN 1 (2)	10 <sup>3.5</sup>	IN	Convencional (4)
1993	Halbur	Homogenado de pulmón	?	IN	Convencional (16) Gnotobiótico (8)
1993	Magar	LHVA-1 y 2 (7-10)	10 <sup>6.2</sup> y 10 <sup>4.6</sup>	IN	Convencional (8)
1994	Halbur	VR2386 (6) VR2428 (6) VR2430 (6) ISU 984 (6)	10 <sup>5</sup>	IN	Gnotobiótico (84)
1994	Rossow	VR 2332 (2)	10 <sup>4.3</sup>	IN	Convencional (50)
1995	Rossow	VR 2332 (8)	10 <sup>2.34</sup>	IN	Gnotobiótico (30)

De los experimentos más completos con el objeto de definir la patogenia de la enfermedad cabe destacar aquellos que han realizado infecciones experimentales con posterior sacrificio y análisis de los animales a tiempo secuenciado.

El primero de estos estudios fue realizado con 6 cerdos gnotobióticos de 6 días de edad (Pol et al., 1991). Estos fueron inoculados intranasalmente y sacrificados a las 24, 48, 60, 72 horas, 6 y 8 días PI. Se observó que los animales sufrían anorexia y depresión a partir del día 2 PI y desarrollaban fiebre que tenía su pico a los 5 días PI (a los 8 días PI volvía a la normalidad). El estudio histológico de estos animales mostró una ligera degeneración de la mucosa nasal, neumonía intersticial, esplenitis reactiva y depleción de linfocitos de órganos linfoides. La detección inmunocitoquímica del virus se logró en células epiteliales de los bronquiolos, de los septos alveolares y bazo.

Un segundo experimento fué realizado con cerdos convencionales y gnotobióticos (Halbur et al., 1993). De 16 cerdos convencionales de 5 semanas, 8 fueron inoculados con un homogenado de pulmón de cerdo infectado y 8 fueron utilizados como controles. Dos cerdos de cada grupo fueron eutanasiados en los días 5, 7, 10 y 15 PI. Estos animales desarrollaron síntomas de depresión,

anorexia y fiebre. En la necropsia, a los 7 días PI se observó la presencia de áreas de ligera depresión y cambio de color en el pulmón que coincidieron microscópicamente con focos de neumonía intersticial, a veces con presencia de células sincitiales. Para el estudio en cerdos gnotobióticos se utilizaron 8 de estos animales, 4 inoculados con un homogenado correspondiente al pulmón de un animal clínicamente afectado, y 4 usados como controles. Se sacrificaron a los 5, 9, 28 y 35 días PI. Todos los animales infectados desarrollaron fiebre, anorexia y alteraciones respiratorias. Los pulmones mostraron el mismo tipo de lesión hallado en animales convencionales hasta los 28 días PI; los animales sacrificados a los 35 días PI tenían lesiones pulmonares mucho más leves. A los 28 días PI también se encontraron infiltrados inflamatorios moderados y multifocales en el plexo coroideo, meninges, miocardio y cornetes nasales.

Un tercer experimento utilizó 84 cerdos gnotobióticos de 4 semanas de edad, que fueron infectados intranasalmente con 4 cepas víricas diferentes a una dosis infectiva de  $10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml (Halbur et al., 1994a). Animales de cada grupo según tipo de cepa vírica fueron sacrificados a los 3, 7, 10, 21, 28 y 36 días PI. En todos los casos se observó lesión pulmonar consistente en una moderada-intensa neumonía intersticial multifocal, a excepción de los animales sacrificados a los 36 días PI; se observaron diferencias en la intensidad de la lesión entre cepas víricas. En los dos últimos grupos de necropsia también fueron observadas lesiones de encefalitis y miocarditis, excepto en el caso de una de las cepas víricas utilizadas. Además, se detectó una anemia no regenerativa que afectó a los animales entre los 3 y 28 días PI. En este trabajo, además de incorporar más datos sobre efectos lesionales secuenciales producidos por efecto del PRRSv, también se aportan datos sobre variabilidad de éstas por efecto de la cepa vírica.

Otro estudio de patogenia de la enfermedad incluye la infección con PRRSv de 50 cerdos convencionales (16 de 4 semanas de edad, 16 de 10 semanas de edad y 18 lechones de 1 semana de edad) (Rossow et al., 1994a). Cada grupo de edad fue dividido en controles y animales infectados, con 2 fechas de sacrificio: 7 y 28 días PI. Los 3 grupos de edad manifestaron anorexia, depresión y fiebre, y en los animales de 1 semana se pudo observar edema periocular y escrotal entre los 6-23 y 11-14 días PI respectivamente. Los animales sacrificados a los 7 días PI mostraron todos ellos una moderada-intensa neumonía intersticial, más intensa en los animales más jóvenes, linfadenopatía generalizada, ligera rinitis catarral y algún animal de 4 y 10 semanas de edad mostró también

manguitos perivasculares en encéfalo. A los 28 días PI se mantiene la lesión pulmonar, con un marcado aumento del grosor de los tabiques interalveolares en cerdos que fueron infectados a 1 semana de edad y con manguitos perivasculares en el pulmón de animales infectados a las 4 y 10 semanas de edad. También se observó hipertrofia e hiperplasia de nódulos linfáticos, miocarditis, rinitis catarral y encefalitis en todos los grupos de edad.

Un último experimento fué realizado con 32 cerdos gnotobióticos de 3 días de edad (Rossow et al., 1995a). Estos animales fueron infectados intranasalmente con una dosis de  $10^{2.34}$  TCID<sub>50</sub>/ml y fueron sacrificados secuencialmente a las 12 horas, 1, 2, 3, 5, 7, 14 y 21 días PI. Los resultados histopatológicos mostraron que la neumonía intersticial se puede observar entre los 3 y 21 días PI, linfadenopatía entre 2 y 21 días PI, necrosis linfoide entre los 5 y 21 días PI, encefalitis entre 7 y 21 días PI, y miocarditis, vasculitis y rinitis entre los 14 y 21 días PI. La sospecha de que estas lesiones vayan más allá de los 21 días es muy clara. Todos estos animales seroconvirtieron desde el día 7 PI. Algunos animales mostraron la presencia de policariocitos en los ganglios linfáticos, pudiendo mostrar éstos, en algunos casos, quistes microscópicos. Una tinción inmunocitoquímica con partículas de oro, mostró la presencia de células positivas (infectadas por PRRSv) especialmente en macrófagos alveolares e intersticiales de pulmón, pero también en células endoteliales y presumiblemente macrófagos intravasculares pulmonares (Rossow et al., 1995b).

Con todos estos resultados pueden establecerse las bases de la patogenia del PRRS:

\* el PRRSv provoca una enfermedad multisistémica, con afección de pulmón, órganos linfoides, vasos, corazón y cerebro (Halbur et al., 1993; Rossow et al., 1994a; Rossow et al., 1995a).

\* se puede detectar viremia tan pronto como a las 12 horas PI (Christianson, 1993; Collins y Rossow, 1993) y puede llegar a persistir hasta 8 semanas en cerdos jóvenes (viremias más cortas en animales maduros) (Wensvoort et al., 1991).

\* entre los 2 y 7 días PI aparecen síntomas clínicos inespecíficos como anorexia, depresión y fiebre (Pol et al., 1991; Collins et al., 1991; Collins et al., 1992; Halbur et al., 1993; Halbur et al., 1994a; Rossow et al., 1994a; Rossow et al., 1995a).

\* el PRRSv se ha podido aislar de pulmón, macrófagos alveolares, hisopos nasales, hisopos orofaríngeos, tonsila, nódulos linfáticos, timo, médula ósea, músculo, suero, leucocitos, cerebro, corazón, bazo, heces y fluido torácico de lechones nacidos muertos o abortados (Pol et al., 1991; Wensvoort et al., 1991; Christianson et al., 1992; Collins et al., 1992; Plana-Duran et al., 1992a; Yoon et al., 1992a; Christianson et al., 1993; Halbur et al., 1993; Halbur et al., 1994a; Rossow et al., 1994a; Mengeling et al., 1994; Mengeling et al., 1995; Rossow et al., 1995a).

\* la multiplicación del virus se produce, probablemente, de forma primaria, en macrófagos alveolares, pero se ha sugerido la multiplicación en macrófagos intersticiales pulmonares, células dendríticas de órganos linfoides, macrófagos intravasculares pulmonares, células endoteliales y monocitos (Benfield et al., 1994; Voicú et al., 1994; Halbur et al., 1995; Rossow et al., 1995b).

\* la afección pulmonar y linfoide es considerada como la forma habitual de los primeros estadios de la enfermedad, mientras que la afectación nasal, cardíaca y cerebral sería típica de estadios tardíos (>14 días PI) (Halbur et al., 1993; Halbur et al., 1994a; Rossow et al., 1994a; Mengeling et al., 1995; Rossow et al., 1995a).

#### **1.8.4 Modelo de patogenia propuesto para el PRRS**

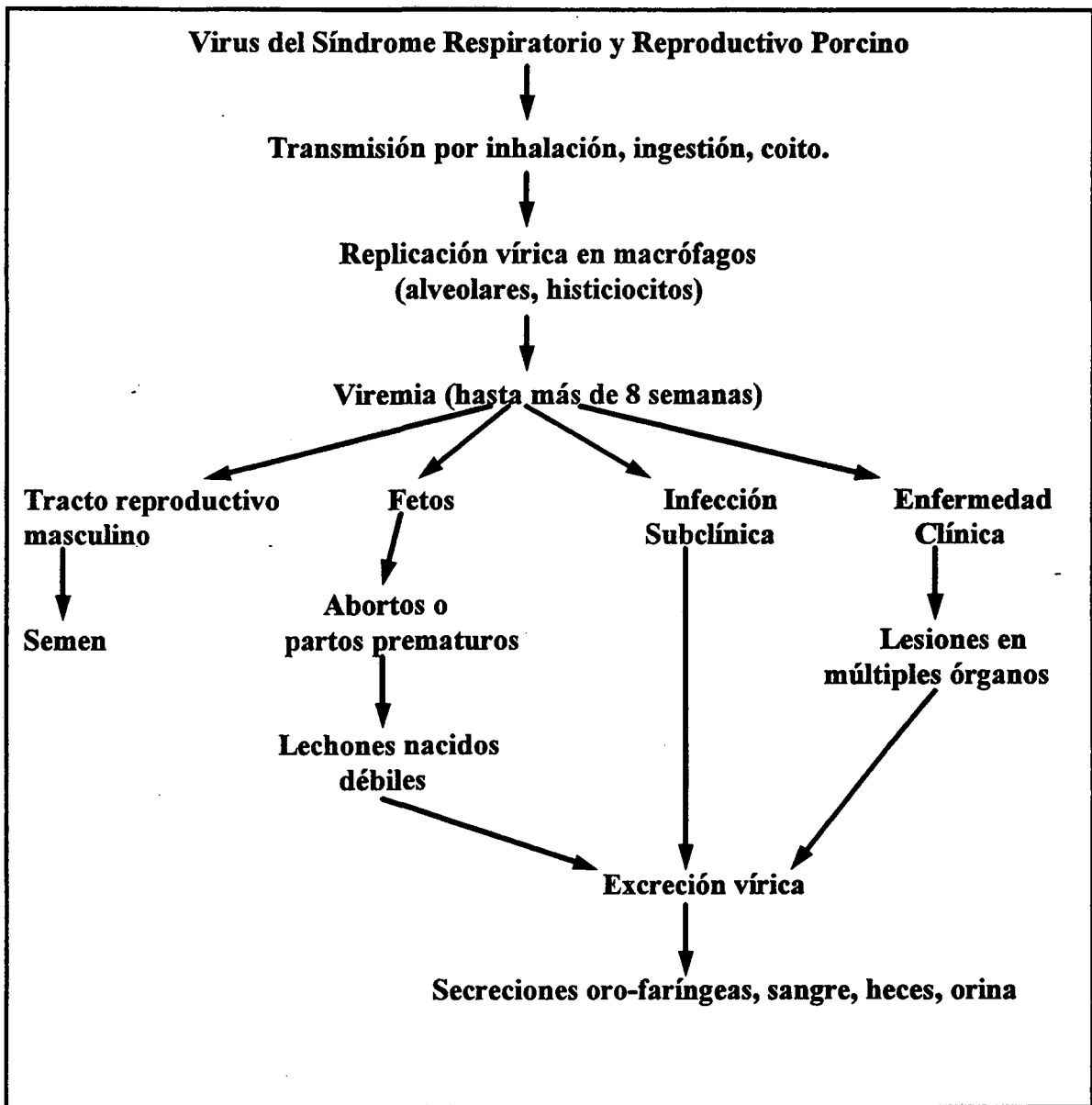
A partir de todos los datos obtenidos hasta ahora sobre la patogenia del PRRSv, se ha propuesto un modelo patogénico para esta enfermedad (Benfield et al., 1994) (Esquema 1).

### **1.9 DIAGNÓSTICO**

El diagnóstico se puede realizar, en términos generales, de 4 formas: por síntomas clínicos, por lesiones histopatológicas, por detección de antígeno y por detección de anticuerpos.



**Esquema 1. Modelo patogénico propuesto para la infección del PRRSv.**



### **1.9.1 Síntomas clínicos**

Hasta el momento, han sido contemplados dos tipos de criterios, especialmente en Europa. El primer criterio contempla 2 fases; una primera en la cual se eliminan enfermedades que muestran una sintomatología parecida al PRRS, y una segunda en la cual se tienen en cuenta una serie de síntomas clínicos de PRRS que afectan a cerdas gestantes y lechones de maternidad (Meredith, 1994). En cuanto a esta segunda fase, los criterios propuestos por Holanda fueron los más utilizados: durante un periodo de 2 semanas y no atribuibles a una enfermedad conocida, la detección de al menos 2 de las 3 características clínicas siguientes (Komijn et al., 1991):

- \* >20% de lechones nacidos muertos
- \* >8% de abortos y partos prematuros
- \* >25% de mortalidad pre-destete

También en Holanda (Shukken et al., 1991) se encontró que la media de lechones nacidos muertos por camada, la media de lechones nacidos vivos por camada y la media de mortalidad pre-destete eran indicativas de infección por PRRS. Si 2 de estos 3 parámetros se desviaban en más de 2.33 veces la desviación standard (con límite de confiabilidad del 99%) en la granja, esto era diagnóstico de PRRS.

No obstante, el mayor problema de este tipo de diagnóstico es que numerosas infecciones moderadas o inaparentes no pueden ser diagnosticadas (Christianson, 1993).

### **1.9.2 Lesiones histopatológicas**

Al igual que en el punto anterior, este sistema diagnóstico tiene un importante problema de sensibilidad dado que la típica lesión de PRRS (Collins et al., 1990; Pol et al., 1991; Collins et al., 1992; Halbur et al., 1993; Halbur et al., 1994a; Rossow et al., 1994a; Rossow et al., 1995a), la neumonía intersticial, no es específica de esta enfermedad y puede ser causada por otros agentes. Un problema añadido es el hecho de que la mayoría de casos de campo se encuentran complicados con microorganismos secundarios y, generalmente, una bronconeumonía catarral-purulenta puede enmascarar las lesiones pulmonares de PRRS (Christianson, 1993).

Otras lesiones que podrían ayudar a caracterizar la enfermedad serían una rinitis catarral (Pol et al., 1991; Collins et al., 1992), encefalitis mononuclear y miocarditis mononuclear (Collins et al., 1992; Halbur et al., 1993; Halbur et al., 1994a; Rossow et al., 1994a; Rossow et al., 1995a), pero no se han observado con la misma frecuencia que la neumonía intersticial.

### **1.9.3 Detección del antígeno**

Básicamente se contemplan distintas técnicas o tipos de sistema diagnóstico, incluyendo aislamiento vírico, inmunofluorescencia sobre tejido congelado, inmunoperoxidasa sobre tejido fijado en formol e incluido en parafina, inmunocitoquímica con oro coloidal sobre tejido fijado en formol e incluido en parafina, microscopía electrónica de transmisión, y reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

**1.9.3.1 Aislamiento vírico.** Se puede realizar sobre cultivos celulares de PAM primarios o líneas celulares continuas tipo CL 2621 y MA-104. El PRRSv se ha podido aislar de suero, plasma, células sanguíneas de la serie blanca, médula ósea, bazo, timo, tonsila, ganglios linfáticos inguinales, peribronquiales, mesentéricos, mandibulares, pulmón, corazón, hígado, ileon, intestino grueso, cometas nasales, traquea, músculo longissimus dorsi, semen, orina y heces (Pol et al., 1991; Wensvoort et al., 1991; Collins et al., 1992; Ohlinger et al., 1992; Plana-Duran et al., 1992a; Yaeger et al., 1993; Rossow et al., 1994a; Mengeling et al., 1994; Rossow et al., 1995a).

**1.9.3.2 Inmunoperoxidasa sobre tejido congelado.** Fué utilizada en los primeros estudios de patogenia del PRRS utilizando un suero policlonal de cerdo convalescente como primer antisuero (Pol et al., 1991). Su aplicación sobre cortes de mucosa nasal, pulmón, bazo, hígado y riñón permitió discernir la presencia de antígeno en pulmón (células epiteliales de bronquiolos y conductos alveolares, células del intersticio interalveolar y células de espacios alveolares) y bazo (células limitantes de la pulpa roja y células de la zona marginal que envuelve el tejido linfático periarteriolar (PALS)).

**1.9.3.3 Inmunoperoxidasa sobre tejido fijado en formol e incluido en parafina.** Es una técnica de aplicación relativamente reciente que utiliza un antisuero monoclonal (SDOW 17, Benfield et al., 1992a) que reconoce un epítipo muy conservado de la nucleocápside del virus. A través de esta prueba se ha podido demostrar la presencia de antígeno en macrófagos alveolares y del intersticio

pulmonar así como en restos celulares en bronquios. También se demostró antígeno en tonsila, mucosa nasal, timo, ganglios linfáticos, bazo y corazón (Halbur y Paul, 1994; Halbur et al., 1994b; Halbur et al., 1995).

**1.9.3.4 Inmunocitoquímica con oro coloidal sobre tejidos fijados en formol e incluidos en parafina.** Se desarrolló utilizando el mismo antisuero de la técnica anterior y se aplicó sobre pulmón, tonsila, ganglios linfáticos, bazo, timo y riñones (Magar et al., 1993). Se logró marcaje positivo en pulmón (macrófagos y células epiteliales de los conductos alveolares), tonsila y ganglios linfáticos. En una variación de la técnica (Rossow, 1995b) aplicada solamente sobre tejido pulmonar se demostró la positividad de células endoteliales y, quizás, a macrófagos intravasculares pulmonares, amén de otras células ya citadas por diferentes autores.

**1.9.3.5 Microscopía electrónica de transmisión.** Ha sido una de las técnicas más utilizadas con el objeto de descubrir la presencia del agente causal de enfermedad sea en tejidos procedentes de animales infectados (Pol et al., 1991; Wensvoort et al., 1992; Ramos et al., 1992) como en cultivos celulares (Pol et al., 1992; Patón et al., 1992; Botner et al., 1994; Dea y Athanassious, 1994).

**1.9.3.6 Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR).** Ha sido recientemente desarrollada utilizando como secuencias de iniciación ("primers") fracciones correspondientes al ORF 7 (Suárez et al. 1994) o al ORF 1b y ORF 7 (Christopher-Hennings et al. 1994b). Con esta técnica se ha podido detectar la presencia de virus en macrófagos, pulmón, hígado, riñón, bazo, ganglios linfáticos inguinal y submaxilar, plasma, células blancas sanguíneas, tonsila, suero y semen. Se trata de una prueba de elevada sensibilidad y muy elevada especificidad.

#### **1.9.4 Detección de anticuerpos**

Hasta el momento se han realizado distintas pruebas serológicas y modificaciones posteriores de éstas. Básicamente se contemplan 4 tipos de prueba: inmunoperoxidasa sobre monocapa de macrófagos (IPMA), inmunofluorescencia sobre cultivo celular (IFA), seroneutralización (SN) y ELISA indirecto.

**1.9.4.1 IPMA.** Fue el primer test en desarrollarse (Wensvoort et al., 1991, 1992a) y, aún actualmente, es el más usado en Europa. Inicialmente la base celular eran PAM primarios pero actualmente pueden utilizarse líneas celulares continuas como CL 2621 y MA-104. Sobre el substrato celular se incuban los sueros porcinos problema, y la unión de inmunoglobulinas G (IgG) de cerdo al substrato se demuestra con un conjugado de peroxidasa anti-IgG de cerdo. Permite demostrar la presencia de anticuerpos no neutralizantes (IgG) tan tempranamente como a los 6 días PI. Se considera un test con alta especificidad pero de sensibilidad media.

**1.9.4.2 IFA.** Es un test equivalente al test IPMA que se utiliza en Europa. Se desarrolló en Estados Unidos (Yoon et al., 1992b; Frey et al., 1992) y tiene las mismas ventajas e inconvenientes que el test anterior. La diferencia estriba en que la presencia de anticuerpos de cerdo se demuestra mediante un conjugado con fluoresceína. Este test ha sido modificado con el objeto de obtener una prueba de coste económico más bajo utilizando una placa de micropocillos en los cuales no se gasta más de 10 µl de reactivos para cada diagnóstico (Mengeling et al., 1993). Otra modificación de este mismo test se ha realizado con el objeto de detectar IgM, las cuales pueden dar una serología positiva a los 3-5 días PI (Park y Joo, 1994).

**1.9.4.3 SN.** El test de SN (Morrison et al., 1992; Frey et al., 1992) permite medir la presencia de anticuerpos neutralizantes hasta más de 6 meses PI, utilizando la línea celular CL 2621 de base, pero es un test de baja sensibilidad en relación a detección de infecciones agudas, dado que los anticuerpos neutralizantes se desarrollan más tardíamente en la infección (30-45 días PI). No obstante, recientemente apareció un test de SN modificado en el cual la adición de complemento permite la detección de los anticuerpos tan tempranamente como 9 y 11 días PI (Yoon et al., 1994a).

**1.9.4.4 ELISA indirecto.** Este test ha sido desarrollado utilizando PAM primarios como célula base, obteniendo unos resultados que van desde una especificidad igual a la IPMA y mayor sensibilidad que esta, especialmente en brotes epizooticos de PRRS (Albina et al., 1992) hasta una menor sensibilidad que el IPMA y unos valores de reacción de fondo inaceptables para algunos animales seronegativos (Edwards et al., 1992). También en Estados Unidos fué desarrollado un ELISA indirecto con buenos resultados en cuanto a especificidad y sensibilidad (Murtaugh et al.,

1993). Recientemente se ha descrito un nuevo **ELISA de bloqueo** (Houben et al., 1995) el cual se muestra más sensible y específico que el IPMA aplicado tanto a sueros de casos de campo como de casos experimentales, y con unos mínimos o nulos niveles de reacción de fondo. Además, la ventaja del ELISA es que se trata de una prueba que puede ser automatizada y su lectura es cuantitativa.

## 1.10 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Desde el momento en que el PRRS quedó definido como entidad clínica, el máximo objetivo consistió en esclarecer la naturaleza etiológica de la enfermedad. Para ello se estableció una lista de agentes incriminados en la producción de enfermedad reproductiva y/o respiratoria en el cerdo que incluyó (Meredith, 1994):

- \* Virus de la Enfermedad de Aujeszky (+)
- \* Virus de la Peste Porcina Africana
- \* Virus de la Peste Porcina Clásica
- \* Virus de la Influenza Porcina (subtipos H1N1 y H3N2)(+)
- \* Virus de la Influenza A Porcina Atípica (neumonía proliferativa necrotizante)(+)
- \* Virus de la Encefalomiocarditis Vírica (+)
- \* Citomegalovirus Porcino
- \* Parvovirus Porcino
- \* Virus de la Encefalomielitis Hemaglutinante
- \* Virus de la Gastroenteritis Transmisibile Porcina
- \* Virus de la Diarrea Epidémica Vírica
- \* Virus de Teschen-Talfan
- \* *Chlamydia psitacci* (+)
- \* *Erysipelothrix rhusiopathiae*
- \* *Leptospira interrogans* serovar *pomona* (+)
- \* *Leptospira interrogans* serovar *bratislava* (+)

De entre todos los agentes destacados solo algunos (los marcados con +) serían de mayor importancia en cuanto a diagnóstico diferencial.

En cuanto a diagnóstico diferencial de enfermedad aguda reproductiva y respiratoria se recomienda la toma de sueros pareados con tres semanas de intervalo y fetos muertos congelados o muy frescos para realizar el aislamiento.

En cuanto al diagnóstico diferencial de enfermedad respiratoria en transición y engorde se recomienda la toma de sueros pareados con tres semanas de intervalo, hisopos nasales y tejido pulmonar para aislamiento vírico, y pulmón fijado en formol para la caracterización lesional.

En cuanto al diagnóstico diferencial de cianosis de orejas hay que pensar que la cianosis puede ser debida a severa toxemia, enfermedad respiratoria terminal o fallo cardíaco. La infección de cerdos con virus de la Diarrea Viral Bovina también puede dar este efecto.

En cuanto al diagnóstico diferencial de partos prematuros, básicamente cabe destacar la enfermedad de Aujeszky y toxoplasmosis.

## **1.11 INMUNIDAD**

El sistema inmunitario comprende una amplia variedad de componentes con el objeto de cooperar en la defensa del hospedador contra agentes infecciosos. Estos componentes pueden ser diferenciados entre sistema inmunitario no específico y específico. El primero de ellos comprende el sistema del complemento, las células fagocíticas (macrófagos, neutrófilos y eosinófilos), las células asesinas naturales (NK) y distintos tipos de interferón (IFN). Estos componentes son muy importantes en el control de la infección durante los primeros días de exposición a un agente, precediendo a la producción de anticuerpos y a la respuesta inmunitaria mediada por células del sistema inmunitario específico (Roth, 1992).

Clínicamente se observa que la inmensa mayoría de cerdos infectados previamente con el PRRSv son inmunes a la reinfección (Loula, 1991; Benfield et al., 1992b), aunque también se ha demostrado en cerdas que a los 4-6 meses posteriores a la primera infección pueden resultar seronegativas y por ello ser de nuevo susceptibles a cursar nuevamente la enfermedad (Ohlinger et al., 1992; Plana-Durán et al., 1992b).

Además de la evidente importancia del desarrollo de anticuerpos, cabe destacar la importancia de la inmunidad celular. Este efecto ha sido definido por el hecho de que el calostro, fuente de inmunidad humoral y presunta inmunidad celular (Tuboly et al., 1988; Williams, 1993), resulta protectoro frente a la infección en lechones, pero no así una transferencia pasiva de inmunoglobulinas anti-PRRS en lechones de 1 semana de edad que no han recibido calostro (Molitor, 1993).

#### **1.11.1 Inmunidad humoral**

Los anticuerpos pueden actuar según varias posibilidades en cuanto a prevención y control de una infección vírica:

- \* neutralizando el virus y evitando así la infección de las células.
- \* opsonizando las partículas víricas permitiendo a células del sistema fagocítico unirse a estos complejos a través de receptores para la fracción cristalizable (Fc) de las inmunoglobulinas y fagocitarlos.
- \* colaborando en los fenómenos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.

Los anticuerpos detectados por las pruebas de IPMA y IFA pueden aparecer como muy temprano a los 6 días PI (Wensvoort et al., 1992a; Yoon et al., 1992b) aumentando en gran medida su título entre 5 y 7 días después. Estos anticuerpos pueden persistir hasta un año (Ohlinger et al., 1992; Meredith, 1994).

El hecho de que puedan concurrir viremia con seropositividad a IFA o IPMA sugiere que los anticuerpos detectados por estas pruebas no son neutralizantes. Se han podido detectar animales vírémicos hasta 2 o más semanas después de haber seroconvertido (Wensvoort et al., 1992b; Meredith, 1994; Rossow et al., 1994a). Las pruebas de neutralización vírica confirman este aspecto,



dado que la seroconversión por estas técnicas no se produce hasta los 30-45 días PI (Joo, 1995). También se ha observado que los animales adultos desarrollan viremias más cortas, y ello va relacionado con el desarrollo de anticuerpos neutralizantes más rápidamente (Collins et al., 1991).

Otros estudios han revelado la posibilidad de aislar virus de tonsila hasta 134 días después del último aislamiento vírico positivo procedente de sangre (Wills et al., 1995). Añadiendo el hecho de que también se ha podido transmitir la infección desde cerdos de 15 semanas PI a cerdos control por contacto (Albina et al., 1994), se puede suponer que, aún no manteniéndose una viremia persistente, sí podría haber una colonización vírica persistente del tracto respiratorio superior, probablemente en tonsila, de manera que aún teniendo animales seropositivos con anticuerpos neutralizantes, estos puedan ser capaces de transmitir la enfermedad (Wills et al., 1995).

Es importante destacar, además, que los anticuerpos neutralizantes solo han podido ser demostrados en cultivos de líneas celulares continuas como la CL 2621; en cambio ningún investigador ha podido demostrar esta neutralización en PAM primarios (Christianson y Joo, 1994).

Otra posibilidad que cabe contemplar por la presencia de anticuerpos anti-PRRSv y el propio virus, podría ser la facilitación de la infección vírica llevada a cabo por células que presenten receptores a Fc; el virus formaría inmunocomplejos, y a través de los citados receptores se unirían a macrófagos. Tal es el caso del Virus de la Lactato-Deshidrogenasa Elevada (LDV) de los ratones, perteneciente a la propuesta familia Arteriviridae, que, al igual que el PRRSv, mejora su replicación en macrófagos con la presencia de anticuerpos (Plagemann y Moenning, 1992). Este mismo efecto ha sido demostrado para el PRRSv, tanto en condiciones *in vitro* (Choi et al., 1992) como *in vivo* (Christianson et al., 1993; Yoon et al., 1994b). Se demostró que la producción de antígeno vírico puede mejorar entre 2 y 4 veces por la presencia de anticuerpos comparado con la infección con virus solo, y mejorar entre 10 y 100 veces los títulos de virus infeccioso. A través de estos resultados se indica la posibilidad de que los anticuerpos contra el PRRSv no siempre protejan contra la infección por este virus y que la presencia de complejos antígeno-anticuerpo en animales infectados resulte en una replicación vírica continua (Choi et al., 1992).

A través de todos estos resultados parece ser que los tests serológicos desarrollados hasta el momento tienen un papel al menos dudoso en cuanto a ser indicadores de la inmunidad de esta enfermedad (Meredith, 1994).

### 1.11.2 Inmunidad celular

Hasta el momento son mínimos los estudios realizados con el objeto de valorar el componente celular de la inmunidad. La infección pulmonar por parte del PRRSv causa drásticos cambios en la población celular procedente de lavado bronco-alveolar en el transcurso de la infección (tabla 5), acompañándose de una disminución de producción de NADPH-oxidasa y anión superóxido de estas células a los 7 días PI, volviendo a valores normales a los 27 días PI. También se demostró que el virus induce un dramático incremento de la expresión de algunas citoquinas inflamatorias (de IL-1 beta, pero no de factor de necrosis tumoral (TNF) ni de factor de crecimiento transformador beta 1 (TGF beta 1)) en el día 7 PI, recuperando los niveles normales a los 27 días PI (Zhou et al., 1992).

Tabla 5. Tipos de células hallados en lavados broncoalveolares de cerdos infectados experimentalmente con PRRSv (Zhou et al., 1992).

Tipo Celular	Control	7 días PI	27 días PI
Macrófagos	>95%	50%	80%
Neutrófilos	<2.5%	35%	---
Linfocitos	<2.5%	15%	20%

La determinación cuantitativa de linfocitos T en sangre periférica indica que no varía significativamente entre animales infectados y controles en el día 7 PI, pero sobre el día 14 PI se observa una importante diferencia entre los dos grupos. En animales infectados el porcentaje de células CD8<sup>+</sup> y dobles negativas disminuyeron a menos del 10% del total, y el número de células CD4<sup>+</sup> y dobles positivas aumentó significativamente (55 y 30% respectivamente). Estos cambios son evidentes hasta los 21 días PI (Zhou et al., 1992). En cerdas a mitad de gestación se realizó un estudio hasta los 12 días PI, en el que se observó una disminución del número total de células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, observándose una ligera disminución no significativa del cociente CD4/CD8 en el grupo de

cerdas infectadas (Christianson et al., 1993). El mecanismo por el cual se produce un cambio de subpoblaciones T no se conoce, pero se ha sugerido la posibilidad de que se produzca una muerte selectiva de poblaciones T, cambios en la expresión de antígenos de superficie de células individuales o redistribución de subpoblaciones en tejidos y sangre (Zhou et al., 1992).

Recientemente se presentó un estudio donde se realizó un ensayo de estimulación de proliferación linfocitaria a un antígeno específico, el PRRSv en este caso, con presencia o no de células presentadoras de antígeno. Se observó una respuesta de proliferación linfocitaria antígeno-específica detectada en animales de 28 días PI, obteniendo un pico máximo a los 49 días PI y empezando a declinar después de 77 días PI. Estas observaciones indican que la infección por PRRSv induce una respuesta inmune celular antígeno-específica y dosis dependiente (Bautista et al., 1994; Molitor, 1995).

### **1.11.3 Inmunosupresión - Inmunomodulación**

Son varias las evidencias de que la infección por PRRSv se encuentra asociada a algún tipo de inmunosupresión (Molitor et al., 1992; Molitor, 1993; Done y Paton, 1995):

- \* el PRRSv parece replicarse exclusivamente en macrófagos.
- \* virus relacionados genéticamente con el PRRSv (como el LDV y el virus de la Arteritis Viral Equina (EAV)) modulan la respuesta inmunitaria del huésped a través de replicación en macrófagos.
- \* múltiples observaciones clínicas de brotes epizooticos de PRRS describen un elevado aumento de infecciones secundarias en cerdos infectados.
- \* la infección experimental con la cepa americana del PRRSv (VR 2332) favorece la presentación de meningitis en cerdos infectados con *Streptococcus suis* tipo II a los 5 días PI vírica (Galina et al., 1993).

Para testar este efecto de inmunosupresión y/o inmunomodulación causado por el PRRSv se valoraron 2 componentes: cambios inducidos en los componentes celulares del órgano primario de replicación (pulmón), cambios inducidos en la producción de anticuerpos contra otros agentes e inmunidad mediada por células. Con estos experimentos se observó que el número de macrófagos

alveolares disminuía en animales infectados (podía llegarse a una destrucción de hasta el 40% de PAM a los 7 días PI) y aumentaba el número de linfocitos y neutrófilos. Además, la liberación de anión superóxido estaba claramente disminuida (valoración funcional de PAM). Sistémicamente, en animales infectados se observó una disminución de leucocitos circulantes, un aumento de la respuesta humoral frente a vacunaciones contra enfermedad de Aujeszky y *Brucella abortus* y un aumento de la inmunidad celular valorada según una respuesta de hipersensibilidad retardada frente a Dinitrofluorobenzeno (DNFB). Colectivamente, todos estos datos demuestran que el PRRSv juega un papel fundamental en las alteraciones del sistema inmunitario del hospedador. Además de la supresión de la respuesta inmunitaria inespecífica por destrucción de PAM, también se produce una mejora de la respuesta sistémica celular contra antígenos específicos (Molitor et al., 1992; Molitor, 1993). La mejora de respuesta contra antígenos específicos probablemente se encuentre relacionada con una activación policlonal de los componentes inmunitarios humorales, tal como ha sido ya descrita en la infección murina por LDV (Plagemann y Moenning, 1992).

## 1.12 TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN

No existe una terapia específica para esta enfermedad. Actualmente se considera que ante la sospecha de un brote epizootico de PRRS la terapia de mantenimiento y el uso de unas medidas concretas de manejo, incluyendo pautas vacunales adecuadas, puedan ayudar a disminuir las pérdidas económicas causadas por esta enfermedad (Loula, 1991; Benfield et al., 1992; Ahl et al., 1992; Meredith, 1994).

En el marco del BVA Trust Symposium, celebrado a finales de 1991 con representantes de Bélgica, Alemania, Holanda y Gran Bretaña, se marcaron una serie de pautas sobre control de la enfermedad y especialmente relacionadas con la posible diseminación de ésta. Los siguientes puntos resumen estas acciones (Ahl et al., 1992):

1. Administrar electrolitos a animales débiles y con diarreas.
2. Tratar a los animales enfermos con antibióticos durante 2 días. Un tratamiento más largo podría suprimir la recuperación.

3. Retrasar la inyección de hierro a 3 días y el corte de colas a 3-5 días.
4. Dejar de inducir los partos.
5. Asegurar la ingestión de calostro natural o artificial a los lechones al nacer y a las 4 horas de vida.
6. Tratar a las cerdas con ácido acetilsalicílico (aspirina) diariamente durante 7 días antes de parir en la comida en las primeras 4 y 6 semanas de duración del brote epizoótico.
7. No servir a las cerdas antes de 21 días después del parto; alargar el tiempo pre-destete.
8. Administrar una dieta altamente energética a las cerdas a las cuales se les desteta la camada durante el brote epizoótico de la enfermedad.
9. Esperar un mínimo de 21 días para cubrir cerdas que han abortado más tarde de los 70 días de gestación.
10. Servir tan pronto como sea posible a cerdas que han abortado antes de los 70 días de gestación.
11. Hacer diagnóstico de gestación precoz semanalmente desde las 4-5 semanas de gestación durante las primeras 4 semanas de brote epizoótico.
12. Realizar inseminación artificial en todas las cerdas durante al menos 6 semanas después del brote epizoótico; los verracos podrían estar también infectados.
13. Intentar detectar la presencia de infecciones secundarias lo más pronto posible.
14. Intentar mantener las rutinas normales de la granja; esto puede ser muy difícil.

Con posterioridad a la publicación de estos datos, aparecieron prácticas con el objeto de erradicar el PRRS. Estas contemplan la despoblación/repoblación total de la granja (Loula, 1991; Dee y Joo, 1993), siendo ésta una operación que generalmente suponía lograr el objetivo de erradicación pero siendo a la vez extremadamente costosa. Otra posibilidad contemplaría la despoblación parcial, centrandolo específicamente en la despoblación de la transición (Dee y Joo, 1993; Dee et al., 1993; Dee y Joo, 1994; Dee et al., 1994) dado que se ha comprobado que en la mayoría de granjas donde se produce recirculación vírica ésta es más intensa en la fase de transición, donde lechones de mayor edad seropositivos infectarían a lechones recién destetados que llegan a la nave de transición (Joo y Dee, 1993). Finalmente, una tercera técnica consiste en la posibilidad de producir cerdos en al menos 2 naves distintas y separadas, respetando las fases de producción y evitando en todo caso la coincidencia en una misma nave de animales de distinta edad (Dee y Joo, 1993). Para su realización sería necesaria, además de un volumen suficiente de animales que permitan el trabajo en bloques o grupos de destete adecuados, tener otras naves donde alojar estos animales. Incluso se han utilizado

estas dos últimas técnicas, despoblación parcial y producción en varios sitios, simultáneamente (Dee et al., 1993). El éxito en la erradicación del PRRS a través de estos métodos está supeditado al seguimiento de un estricto control de limpieza de la granja, movimiento controlado de animales y aplicación de medidas de bioseguridad de la granja (Dee y Joo, 1994).

Recientemente han aparecido vacunas contra el PRRSv disponibles comercialmente en España y Estados Unidos. La vacuna española es una vacuna frente a los procesos reproductivos de la cerda causados por esta enfermedad, y contiene una cepa vírica española inactivada, con adyuvante oleoso y un conservante. Los primeros estudios de campo han mostrado una disminución en el porcentaje de repeticiones, aumento del porcentaje de fertilidad, aumento del número de lechones destetados por cerda y año, disminución del porcentaje de abortos y disminución del número de lechones nacidos muertos (Plana-Duran y Vilá-Molás, 1995). La vacuna americana es una vacuna frente a los procesos respiratorios del cerdo causados por PRRSv y contiene un virus modificado vivo (Polson, 1995). Los primeros estudios de campo con esta vacuna han mostrado una mejoría clínica de los animales vacunados frente a controles no vacunados, aumento del crecimiento diario, disminución de mortalidad y disminución del número de tratamientos por cerdo y año (Gorcycya et al., 1995). Perspectivas futuras indican el interés de clonar proteínas recombinantes del PRRSv producidas en un sistema de baculovirus recombinantes y utilizar éstas como antígenos vacunales (Plana-Duran y Vilá-Molás, 1995, Plana-Duran et al., 1995).

### **1.13 BIBLIOGRAFÍA**

- AHL, R.; PENSAERT, M.; ROBERTSON, I.B.; TERPSTRA, C.; VAN DER SANDE, W.; WALKER, K.J.; WHITE, M.E.C.; MEREDITH, M.  
Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS or blue ear disease).  
Vet. Rec., 130: 87-89, 1992.
- ALBINA, E.; LEFORBAN, Y.; BARON, T.; PLANA-DURAN, J.; VANNIER, P.  
An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus.  
Ann. Rech. Vet., 23: 167-176, 1992.
- ALBINA, E.; MADEC, F.; CARIOLET, R.; TORRISON, J.  
Immune response and persistence of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus in infected pigs and farm units.  
Vet. Rec., 134: 567-573, 1994.
- BANE, D.P.; HALL, W.F.  
Fumonisin as a predisposing factor for "mystery swine disease".  
Proc. Livest. Conserv. Inst., Mystery Swine Dis. Comm. Meet., 77-79, 1990.

BARON, T.; ALBINA, E.; LEFORBAN, Y.; MADEC, F.; GUILMOTO, H.; PLANA-DURAN, J.; VANNIER, P.  
Report on the first outbreaks of the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) in France - Diagnosis and viral isolation.

Ann. Rech. Vet., 23: 161-166, 1992.

BAUTISTA, E.M.; GOYAL, S.M.; YOON, I.J.; JOO, H.S.; COLLINS, J.E.  
Comparison of porcine alveolar macrophages and CL 2621 for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus and anti-PRRS antibody.

J. Vet. Diagn. Invest., 5(2): 163-165, 1993.

BAUTISTA, E.M.; CHOI, C.S.; SUMSTAD, R.; MOLITOR, T.W.  
Lymphocyte proliferation response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV).

Proc. 75th Ann. Meet. CRWAD, 83, 1994.

BENFIELD, D.W.; NELSON, E.; COLLINS, J.E.; HARRIS, L.; GOYAL, S.M.; ROBINSON, D.; CHRISTIANSON, W.T.; MORRISON, R.B.; GORCYCA, D.; CHLADEK, D.

Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (ATCC VR 2332).

J. Vet. Diagn. Invest. 4: 127-133, 1992a.

BENFIELD, D.A.; COLLINS, J.E.; JENNY, A.L.; LOULA, T.J.

Porcine reproductive and respiratory syndrome.

En: Diseases of swine 7th Edition, Ed. Leman, A.D.; Straw, B.E.; Mengeling, W.L.; D'Allaire, S.; Taylor, D.J., 756-762, 1992b.

BENFIELD, D.A.; NELSON, E.A.; CHRISTOPHER-HENNINGS, J.; CHASE, C.C.L.; COLLINS, J.E.; ROSSOW, K.D.

Recent advances on the pathogenesis of PRRS.

Proc. Livest. Conserv. Inst., 113-116, 1994.

BLAHA, T.

Epidemiological investigations into PEARs in Germany: consequences in fattening pigs.

Proc. 12th IPVS Congress, 1:126, 1992.

BLOEMRAAD, M.; KLUIJVER, E.P.; PETERSEN, A.; BURKHARDT, G.E.; WENSVOORT, G.

Porcine reproductive and respiratory syndrome: temperature and pH stability of Lelystad virus and its survival in tissue specimens from viraemic pigs.

Vet. Micro., 42: 361-371, 1994.

BOLIN, C.A.; CASSELLS, J.E.

Isolation of *Leptospira interrogans* serovar bratislava from stillborn and weak pigs in Iowa.

J. Am. Vet. Med. Assoc. 196: 1601-1604, 1990.

BOTNER, A.; NIELSEN, J.; BILLE-HANSEN, V.

Isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a Danish swine herd and experimental infection of pregnant gilts with the virus.

Vet. Micro., 40: 351-360, 1994.

CHO, S.H.; FREESE, W.R.; YOON, I.J.; TRIGO, A.V.; JOO, H.S.

Seroprevalence of indirect fluorescent antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in selected swine herds.

J. Vet. Diagn. Invest., 5(2): 259-260, 1993.

CHOI, C.S.; CHRISTIANSON, W.T.; COLLINS, J.E.; JOO, H.S.; MOLITOR, T.W.  
Antibody-dependent enhancement of SIRS virus replication.  
Am. Assoc. Swine Pract. Newsl., 4: 30, 1992.

CHRISTIANSON, W.T.; COLLINS, J.E.; BENFIELD, D.A.; HARRIS, L.; GORCYCA, D.; CHLADEK, D.;  
MORRISON, R.B.; JOO, H.S.  
Experimental reproduction of swine infertility and respiratory syndrome in pregnant sows.  
Am. J. Vet. Res., 53: 485-488, 1992.

CHRISTIANSON, W.T.  
Clinical, etiologic and pathogenic investigation of an emergent porcine reproductive disease.  
Tesis doctoral, Universidad de Minnesota, 1993.

CHRISTIANSON, W.T.; CHOI, C.S.; COLLINS, J.E.; MOLITOR, T.W.; MORRISON, R.B.; JOO, H.S.  
Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in mid-gestation sows and fetuses.  
Can. J. Vet. Res., 57: 262-268, 1993.

CHRISTIANSON, W.T.; JOO, H.S.  
Porcine reproductive and respiratory syndrome: a review.  
Swine Health Prod. 2(2): 10-28, 1994.

CHRISTOPHER-HENNINGS, J.; NELSON, E.A.; HINES, B.J.; NELSON, J.K.; CHASE, C.C.L.; BENFIELD,  
D.A.; YAEGER, M.J.  
Shedding of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the semen of experimentally infected boars.  
Proc. 75th Ann. Meet. CRWAD, P88, 1994.

CHRISTOPHER-HENNINGS, J.; NELSON, E.A.; HINES, B.J.; SWENSON, S.L.; ZIMMERMAN, J.; HILL, H.T.;  
KATZ, J.B.; CHASE, C.C.L.; YAEGER, M.J.; BENFIELD, D.A.  
Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boar semen using the polymerase chain reaction.  
Proc. 75th Ann. Meet. CRWAD, 197, 1994.

COLLINS, J.E.; SHAW, D.P.; GOYAL, S.M.; BENFIELD, D.A.  
Respiratory disease in a swine herd experiencing a reproductive failure syndrome.  
Proc. Minn. Swine Conf. Vet., 206-207, 1990.

COLLINS, J.E.  
Newly recognized respiratory syndromes in North American swine herds.  
Am. Assoc. Swine Pract. Newsl. 3(5): 7-10, 1991.

COLLINS, J.E.; BENFIELD, D.A.; CHRISTIANSON, W.T.; HARRIS, L.; CHRISTOPHER-HENNINGS, J.;  
SHAW, D.P.; GOYAL, S.M.; MCCULLOUGH, S.; MORRISON, R.B.; JOO, H.S.; GORCYCA, D.; CHLADEK, D.  
Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR 2332) in North America and  
experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs.  
J. Vet. Diagn. Invest., 4(2): 117-126, 1992.

COLLINS, J.E.  
Porcine reproductive and respiratory syndrome.  
Proc. 44th Ann. Meet. Am. Coll. Vet. Pathol., 130-136, 1993.

COLLINS, J.E.; ROSSOW, K.D.  
Pathogenesis of PRRS.  
Proc. Allen D. Leman Conf., 47-48, 1993.



CONZELMANN, K.K.; VISSER, N.; VAN WOENSEL, P.; THIEL, H.J.  
Molecular characterization of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus, a member of the Arterivirus Group.  
Virol. 193: 329-339, 1993.

CORREA-GIRÓN, P.; COBA, M.A.; WEIMERSHEIMER, J.; ANAYA, E.; MILLIAN, F.; CANTO, J.  
Presence of antibodies against pig abortion and respiratory syndrome (PEARS) in imported and negative pigs from several areas of Mexico.  
Proc. 13th IPVS Congress, 26, 1994.

DEA, S.A.; BILODEAU, R.; ATHANASSIOUS, R.; SAUVAGEAU, R.A.; MARTINEAU, G.P.  
PRRS in Quebec: virologic and pathologic aspects.  
Am. Assoc. Swine Pract. Newsl., 4: 2-7, 1992.

DEA, S.A.; ATHANASSIOUS, R.  
The morphogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in MARC-145 cells.  
Proc. 75th Ann. Meet. CRWAD, P83, 1994.

DEE, S.A.; JOO, H.S.  
PRRS clinical management and control: eradication from herds.  
Proc. Allen D. Leman Conf., 93-97, 1993.

DEE, S.A.; MORRISON, R.B.; JOO, H.S.  
Erradicating porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus using two-site production and nursery depopulation.  
Swine Health Prod., 1(5): 20-23, 1993.

DEE, S.A.; JOO, H.S.  
Prevention of the spread of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in endemically infected pig herds by nursery depopulation  
Vet. Rec., 135: 6-9, 1994.

DEE, S.A.; JOO, H.S.; PUJOAN, C.  
Control of porcine reproductive and respiratory syndrome virus transmission: handling infected seedstock.  
Com. Cont. Educ., 16(7): 927-933, 1994.

DIAL, G.D.; PARSONS, T.  
SMEDI-like syndrome (EMC?).  
Proc. Am. Assoc. Swine Pract., 5-7, 1989.

DIAL, G.D.; HULL, R.D.; OLSON, C.L.; HILL, H.T.; ERIKSON, G.A. Mystery swine disease: implications and needs of the North American swine industry.  
Proc. Livest. Conserv. Inst., Mystery Swine Dis. Comm. Meet., 3-6, 1990.

DONE, S.H.; PATON, D.J.; BROWN, I.; SCOTT, A.; COOLEY, W.  
Pathology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) in the UK.  
Proc. 12th IPVS Congress, 1: 111, 1992.

DONE, S.H.; PATON, D.J.  
Porcine reproductive and respiratory syndrome: clinical disease, pathology and immunosuppression.  
Vet. Rec., 136: 32-35, 1995.

EDWARDS, S.; ROBERTSON, I.B.; WILESMITH, J.W.; RYAN, J.B.; KILNER, C.G.; PATON, D.J.; DREW, T.W.; BROWN, I.; SANDS, J.  
PRRS (blue-eared pig disease) in Great Britain.  
Am. Assoc. Swine Pract. Newsl., 4: 32-36, 1992.

FEITSMA, H.; GROOTEN, H.J.; SCHIE, F.W.V.; COLENBRANDER, B.

Effect of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS) on sperm production.  
Proc. 12th Int. Congress Anim. Reprod., 1710-1712, 1992.

FICHTNER, D.; BEYER, J.; LEOPOLDT, D.; SCHIRRMIEIER, H.; BERGMAN, S.; FISHER, U.

Experimentelle Reproduktion der respiratorischen Verlaufsform der Infektion mit dem Erreger des Seuchenhaften Spätabortes der Schweine  
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 106: 145-149, 1993.

FREY, M.L.; EERNISSE, K.A.; LANDGRAF, J.G.; PEARSON, J.E.; CHLADEK, D.W.

Diagnostic testing for SIRS virus at the National Veterinary Services Laboratories (NVSL).  
Am. Assoc. Swine Pract. Newsl., 4: 31, 1992.

GALINA, L.; PIJOAN, C.; SITJAR, M.; CHRISTIANSON, W.T.; ROSSOW, K.D.; COLLINS, J.E.

Interaction between *Streptococcus suis* serotype 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in specific pathogen-free piglets.  
Vet. Rec., 134: 60-64, 1994.

GOOVAERTS, D.; VISSER, N.

Vascular lesions in pigs infected with PRRS.  
Proc. 12th IPVS Congress, 129, 1992.

GORCYCA, D.; SPIESS, D.; HARRIS, L.; SCHLESINGER, K.; CHLADEK, D.; MORRISON, R.B.; SCHULTZ, R.  
The effect of a previous porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus challenge in pregnant sows after subsequent exposure to virulent virus.

Proc. 24th Ann. Meet. AASP, 51-52, 1993.

GORCYCA, D.; SPRONK, G.; MORRISON, R.B.; POLSON, D.D.

Field evaluation of a new MLV PRRS virus vaccine: applications for PRRS prevention and control in swine herds.  
Proc. 26th Ann. Meet. AASP, 401-411, 1995.

GORDON, S.C.

Effects of blue-eared pig disease on a breeding and fattening unit.  
Vet. Rec., 130: 513-514, 1992.

GOYAL, S.M.

Porcine reproductive and respiratory syndrome.  
J. Vet. Diagn. Invest., 5: 656-664, 1995.

HALBUR, P.G.; PAUL, P.S.; ANDREWS, J.J.; SANDERSON, T.P.; ROSS, R.F.; SCHWARTZ, K.J.; FREY, M.L.; ERICKSON, B.J.; HILL, H.T.; HOFFMAN, L.J.

Experimental transmission of an apparent viral pneumonia in conventional and gnotobiotic pigs.  
Vet. Rec., 132: 263-266, 1993.

HALBUR, P.G.; PAUL, P.S.; MENG, X.J.; HAGEMOSER, W.

Marked variability in pathogenicity of nine U.S. porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates in 5 week-old CDCD pigs.  
Proc. 13th IPVS Congress, 14, 1994a.

HALBUR, P.G.; ANDREWS, J.J.; HUFFMAN, E.L.; PAUL, P.S.; MENG, X.J.; NIYO, Y.

Development of a streptavidin-biotin immunoperoxidase procedure for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus antigen in porcine lung.  
J. Vet. Diagn. Invest., 6: 254-257, 1994b.

HALBUR, P.G.; PAUL, P.S.

Development and use of a quick immunoperoxidase test on formalin-fixed tissues for PRRSV identification.  
Proc. 25th Ann. Meet. AASP, 346-347, 1994.

HALBUR, P.G.; ANDREWS, J.J.; PAUL, P.S.; RATHJE, J.

Strain variation of PRRS virus: field and research experiences.  
Proc. 26th Ann. Meet. AASP, 391-394, 1995a.

HALBUR, P.G.; MILLER, L.D.; PAUL, P.S.; MENG, X.J.; HUFFMAN, E.L.; ANDREWS, J.J.

Immunohistochemical identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antigen in the heart and lymphoid system of three-week-old colostrum-deprived pigs.  
Vet. Pathol., 32: 200-204, 1995b.

HOOPER, C.C.; VAN ALSTINE, W.G.; STEVENSON, G.W.; KANITZ, C.L.

Mice and rats (laboratory and feral) are not a reservoir for PRRS virus.  
J. Vet. Diagn. Invest., 6: 13-15, 1994.

HOPPER, S.A.; WHITE, M.E.C.; TWIDDY, N.

An outbreak of blue-eared pig disease (porcine reproductive and respiratory syndrome) in four herds in Great Britain.  
Vet. Rec., 131: 140-144, 1992.

HOUBEN, S.; CALLEBAUT, P.; PENSAERT, M.B.

Comparative study of a blocking enzyme-linked immunosorbent assay and the immunoperoxidase monolayer assay for the detection of antibodies to the porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pigs.  
J. Virol. Meth., 51: 125-128, 1995.

JOO, H.S.; DEE, S.A.

Recurrent PRRS problems in nursery pigs.  
Proc. Allen D. Leman Conf., 85-86, 1993.

JOO, H.S.

Interpretation of PRRS serology.  
Proc. 26th Ann. Meet. AASP, 397-399, 1995.

KATZ, J.B.; SHAFER, A.L.; EERNISSE, K.A.; LANDGRAF, J.G.; NELSON, E.A.

Antigenic differences between European and American porcine reproductive and respiratory syndrome viruses (PRRSV) are encoded by open reading frame 3 (ORF 3).  
Proc. 75th Ann. Meet. CRWAD, 199, 1994.

KEFFABER, K.K.

Reproductive failure of unknown etiology.  
Am. Assoc. Swine Pract. Newsl., 1: 1-10, 1989.

KEFFABER, K.K.; STEVENSON, G.; VAN ALSTINE, G.W.; KANITZ, C.; HARRIS, L.; GORCYCA, D.; SCHLESINGER, K.; SCHULTZ, R.; CHLADEK, D.; MORRISON, R.B.

SIRS virus infection in nursery/grower pigs.  
Am. Assoc. Swine Pract. Newsl., 4: 38-39, 1992.

KIM, H.S.; KWANG, J.; YOON, I.J.; JOO, H.S.; FREY, M.L.

Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line.  
Arch. Virol., 133: 477-483, 1993.

KOMIJN, R.E.; VAN DER SANDE, W.J.H.; VAN KLINK, E.G.M.

Report on the epidemiology of PEARS in the Netherlands.  
European Comm. Seminar on PRRS, Conf. n° 3, 1991.

LAGER, K.M.; MENGELING, W.L.; ACKERMANN, M.R.

Porcine reproductive and respiratory syndrome: current concepts of the pathogenesis of maternal reproductive failure.  
Proc. Livest. Conserv. Inst., 102-106, 1993.

LAGER, K.M.; ACKERMANN, M.R.

Pulmonary lesions in fetuses exposed to porcine reproductive and respiratory syndrome virus.  
J. Vet. Diagn. Invest., 6:480-483, 1994.

LAGER, K.M.; MENGELING, W.L.; BROCKMEIER, S.L.

Consequences of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome virus (PEARSV) infection in bred gilts at different stages of gestation.  
Proc. 13th IPVS Congress, 9, 1994a.

LAGER, K.M.; MENGELING, W.L.

Homologous and heterologous challenge of porcine reproductive and respiratory syndrome virus immunity in pregnant swine.  
Proc. 37th Ann. Meet. AAVLD, 39, 1994b.

LINDHAUS, W.; LINDHAUS, B.

Ratselhafte Schweinekrankheit.  
Der Praktische Tierarzt., 5: 423-425, 1991.

LOULA, T.

Mystery swine disease.  
Agri-practice, 12: 23-34, 1991.

MAGAR, R.; LAROCHELLE, R.; ROBINSON, Y.; DUBUC, C.

Immunohistochemical detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus using colloidal gold.  
Can. J. Vet. Res., 57: 300-304, 1993.

MARDASSI, H.; ATHANASSIOUS, R.; MOUNIR, S.; DEA, S.

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: morphological, biochemical and serological characteristics of Quebec isolates associated with acute and chronic outbreaks of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome.  
Can. J. Vet. Res., 58: 55-64, 1994a.

MARDASSI, H.; MOUNIR, S.; DEA, S.

Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) ORFS 4 to 7 product.  
Proc. 75th Ann. Meet. CRWAD, 200, 1994b.

MELDRUM, K.C.

Prevention and control of animal diseases.

En: Animal Health 1991: report of the chief veterinary officer. Ed. Edwards, A.; Harkness, J.; Bush, A., Londres, 5-8, 1992

MENG, X.J.; PAUL, P.S.; HALBUR, P.G.; LUM, M.A.

Genetic variation of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses (PRRSV): implication for independent evolution of PRRSV in the U.S. and Europe.  
Proc. 75th Ann. Meet. CRWAD, 202, 1994.

MENGELING, W.L.; LAGER, K.M.

Mystery pig disease: evidence and considerations for its etiology.  
Proc. Livest. Conserv. Inst., Mystery Swine Dis. Comm. Meet., 88-90, 1990.

MENGELING, W.L.; LAGER, K.M.; VORWALD, A.C.

Identification and titration of antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome virus using indirect immunofluorescence microscopy and microwell cell culture plates.

Proc. Livest. Conserv. Inst., 95-99, 1993.

MENGELING, W.L.; LAGER, K.M.; VORWALD, A.C.

Temporal characterization of transplacental infection of porcine fetuses with porcine reproductive and respiratory syndrome virus.

Am. J. Vet. Res., 55(10): 1391-1398, 1994.

MENGELING, W.L.; LAGER, K.M.; VORWALD, A.C.

Diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome.

J. Vet. Diagn. Invest., 7(1): 3-16, 1995.

MEREDITH, M.J.

Blue ear disease epidemic.

Pigs News and Info., 12: 363, 1991.

MEREDITH, M.J.

Review of porcine reproductive and respiratory syndrome.

Pig Dis. and Info. Centre, Cambridge, July 1992.

MEREDITH, M.J.

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS)

Pig Dis. and Info. Centre, Cambridge, August 1994.

MEULENBERG, J.J.M.; DE MEIJER, E.J.; MOORMANN, J.M.

Subgenomic RNAs of Lelystad virus contain a conserved leader-body junction sequence.

J. Gen. Virol., 74: 1697-1701, 1993a.

MEULENBERG, J.J.M.; HULST, M.M.; DE MEIJER, E.J.; MOONEN, P.L.J.M.; DEN BESTEN, A.; DE KLUYVER, E.P.; WENSVOORT, G.; MOORMANN, R.J.M.

Lelystad virus, the cause of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV.

Viol., 192: 62-72, 1993b.

MEULENBERG, J.J.M.; HULST, M.M.; DE MEIJER, E.J.; MOONEN, P.L.J.M.; DEN BESTEN, A.; DE KLUYVER, E.P.; WENSVOORT, G.; MOORMANN, R.J.M.

Lelystad virus belongs to a new family, comprising lactate dehydrogenase-elevating virus, equine arteritis virus, and simian hemorrhagic fever virus.

Arch. Virol. (Suppl.), 9: 441-448, 1994.

MOLITOR, T.W.; LEITNER, G.; CHOI, C.S.; RISDAHL, J.; ROSSOW, K.D.; COLLINS, J.E.

Modulation of host immune response by SIRS virus.

Am. Assoc. Swine Pract. Newsl., 4: 27-28, 1992.

MOLITOR, T.W.

Immune responses to PRRS virus.

Proc. Allen D. Leman Conf., 49-50, 1993.

MOLITOR, T.W.

Immune response to PRRS virus.

Proc. 26th Ann. Meet. AASP, 395-396, 1995.

MORRISON, R.B.; BAUTISTA, E.; GOYAL, S.; COLLINS, J.E.; ANNELLI, J.  
Seroprevalence of SIRS virus in the United States in 1990.  
Am. Assoc. Swine Pract. Newsl., 4: 47, 1992.

MORTENSEN, S.; MADSEN, K.  
The occurrence of PRRS in Denmark.  
Am. Assoc. Swine Pract. Newsl., 4: 48, 1992.

MURTAUGH, M.P.; JONES, D.; MORRISON, R.B.; GORCYCA, D.; ELAM, M.  
Development of a sensitive and specific ELISA immunoassay for the detection of PRRS virus.  
Proc. Livest. Conserv. Inst., 114, 1993.

OHLINGER, V.F.; AHL, R.; HAAS, B.; METTENLEITER, T.C.; RZIHA, H.J.; SAALMULLER, A.; STRAUB, O.C.; VISSER, N.; WEILAND, E.; WEILAND, F.  
The german experience with the swine infertility and respiratory syndrome (SIRS).  
MN Swine Conf. Vet., Addendum, 1991.

OHLINGER, V.; HAAS, B.; SAALMULLER, A.; BEYER, J.; TEUFFERT, J.; VISSER, N.; WEILAND, F.  
*In vivo* and *in vitro* studies on the immunobiology of PRRS.  
Am. Assoc. Swine Pract. Newsl., 4: 24, 1992.

OWEN, W.J.; UNLENHOPP, E.K.; HILL, H.T.; FREY, M.L.; EERNISSE, K.A.; ZIMMERMANN, J.  
Preliminary analysis of the Iowa NAHMS swine serum bank.  
Proc. Livest. Conserv. Inst., SIRS Com. Meet., 243-244, 1992.

PARK, B.K.; JOO, H.S.  
Detection of Ig M antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus for recent viral infection in pigs.  
Proc. 75th Ann. Meet. CRWAD, P86, 1994.

PATON, D.J.; BROWN, I.H.; SCOTT, A.C.; DONE, S.H.; EDWARDS, S.  
Isolation of a Lelystad virus-like agent from British pigs and scanning electron microscopy of infected macrophages.  
Vet. Micro., 33: 195-201, 1992.

PATON, D.J.; DONE, S.H.  
Porcine reproductive and respiratory syndrome (blue-eared pig disease).  
Vet. Ann., 32: 278-292, 1992.

PIJOAN, C.; SOLANO, G.I.; SEGALES, J.  
PRRS virus and secondary disease.  
Proc. Allen D. Leman Conf., 225-226, 1994.

PLAGEMANN, P.G.W.; MOENNING, V.  
Lactate deshydrogenase-elevating virus, equine arteritis virus, and simian hemorrhagic fever virus: a new group of positive-stranded RNA viruses.  
Adv. Virus Res., 41: 99-192, 1992.

PLANA-DURAN, J.; VAYREDA, M.; VILARRASA, J.; BASTONS, M.; ROSELL, R.; MARTINEZ, M.; SAN GABRIEL, A.; PUJOLS, J.; BADIOLA, J.L.; RAMOS, J.A.; DOMINGO, M.  
Porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease). Isolation in Spain of the causative agent and experimental reproduction of the disease.  
Vet. Micro., 33: 203-211, 1992A.

PLANA-DURAN, J.; VAYREDA, M.; VILARRASA, J.; BASTONS, M.; PORQUET, L.; URNIZA, A.  
PEARS (Mystery swine disease) - summary of the work conducted by our group.  
Am. Assoc. Swine Pract. Newsl., 4: 16-18, 1992B.

PLANA-DURAN, J.; VILA-MOLAS, X.

Inmunoprofilaxis contra el virus de la enfermedad reproductiva y respiratoria de la cerda.  
*Anaporc*, 144: 5-14, 1995.

PLANA-DURAN, J.; CLIMENT, I.; URNIZA, A.; CASAL, I.

Recombinant baculovirus vaccines against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome.  
Proc. II International Symposium on PRRS, P9, 1995.

POL, J.M.A.; VAN DIJK, J.E.; WENSVOORT, G.; TERPSTRA, C.

Pathological, ultrastructural, and immunohistochemical changes caused by Lelystad virus in experimentally induced infections of mystery swine disease (synonym: porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS)).  
*Vet. Q.*, 13: 137-143, 1991.

POLSON, D.D.; MARSH, W.E.; DIAL, G.D.

Financial implications of mystery swine disease (MSD).  
Proc. Livest. Conserv. Inst., MSD Comm. Meet., 28-31, 1990.

POLSON, D.D.

RespPRRS: a PRRS vaccine review.  
PRRS/respPRRS Reference Guide, NOBL Labs., 1995.

PRIETO, C.; SUAREZ, P.; SANCHEZ, R.; SOLANA, A.; SIMARRO, I.; MARTIN RILLO, S.; CASTRO, J.M.

Semen changes in boars after experimental infection with porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS) virus.  
Proc. 13th. IPVS Congress, 27, 1994.

RAMOS, J.A.; PUJOLS, J.; DOMINGO, M.; MILLER, M.; ROSELL, R.; BADIOLA, I.; PEREZ DE ROZAS, A.; MAJO, N.; SAN GABRIEL, A.

Experimental infection of weaner pigs with PRRS.  
*Am. Assoc. Swine Pract. Newsl.*, 2: 25, 1992.

RAYMAKERS, J.M.L.

The experience of the veterinary practice in Someren (Netherlands) with PEARs.  
European Comm. Seminar on PRRS, Conf. n° 16, 1991.

ROBERTSON, I.B.

The epidemiology of PRRS in the United Kingdom.  
European Comm. Seminar on PRRS, Conf. n° 5, 1991.

ROSSOW, K.D.; BAUTISTA, E.M.; GOYAL, S.M.; MOLITOR, T.W.; MURTAUGH, M.P.; MORRISON, R.B.; BENFIELD, D.A.; COLLINS, J.E.

Experimental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in one-, four-, and 10-week old pigs.  
*J. Vet. Diagn. Invest.*, 6: 3-12, 1994a.

ROSSOW, K.D.; MORRISON, R.B.; GOYAL, S.M.; SINGH, G.S.; COLLINS, J.E.

Lymph node lesions in neonatal pigs congenitally exposed to porcine reproductive and respiratory syndrome virus.  
*J. Vet. Diagn. Invest.*, 6: 368-371, 1994b.

ROSSOW, K.D.; COLLINS, J.E.; GOYAL, S.M.; NELSON, E.A.; CHRISTOPHER-HENNINGS, J.; BENFIELD, D.A.

Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in gnotobiotic pigs.  
*Vet. Pathol.*, 361-373, 1995a.

ROSSOW, K.D.; COLLINS, J.E.; GOYAL, S.M.; NELSON, E.A.; CHRISTOPHER-HENNINGS, J.; BENFIELD, D.A.

Chronological immunohistochemical detection and localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in gnotobiotic pigs.

Proc. 38th Annual Meeting AAVLD, 29, 1995b.

ROTH, J.A.

Immune system.

En: Diseases of swine 7th Edition, Ed. Leman, A.D.; Straw, B.E.; Mengeling, W.L.; D'Allaire, S.; Taylor, D.J., 21-39, 1992.

SANFORD, S.E.

Porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS): establishment and spread between 1987 and 1992 in Ontario, Canada.

Proc. 12th IPVS Congress, 1: 117, 1992.

SCHUKKEN, Y.H.; DE JONG, M.F.; KOMIJN, R.E.; BRAAMSKAMP, J.; DIJKHUIZEN, A.A.; NOORDHUIZEN, J.P.; VERNOOY, J.C.; VERHEIJDEN, J.H.

Porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS) - positive and PEARS negative diagnoses in pig breeding and reproduction farms in the Netherlands using statistical methods.

Tijdschr. Diergeneeskd., 117: 259-264, 1992.

STOCKHOFE-ZURWIEDEN, N.; NAVARRO-CAMARRO, J.A.; GROSSE-BEILAGE, E.; CHAVEZ, J.; POHLENZ, J.

Uterine and placental alterations in pregnant sows associated with the porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS).

J. Vet. Med. B, 40: 261-271, 1993.

SUAREZ, P.; ZARDOYA, R.; PRIETO, C.; SOLANA, A.; TABARES, E.; BAUTISTA, J.M.; CASTRO, J.M.

Direct detection of the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus by reverse polymerase chain reaction (RT-PCR).

Arch. Virol., 135: 89-99, 1994.

SWENSON, S.L.; HILL, H.T.; ZIMMERMAN, J.J.; EVANS, L.E.; LANDGRAF, J.G.; WILLS, R.W.; SANDERSON, T.P.; MCGINLEY, M.J.; BREVIK, A.K.; CISZEWSKY, D.K.; FREY, M.L.

Excretion of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen after experimentally induced infection in boars.

J. Am. Vet. Med. Assoc., 204(12): 1943-1948, 1994.

SWENSON, S.L.; HILL, H.T.; ZIMMERMAN, J.J.; EVANS, L.E.; WILLS, R.W.; YOON, K.J.; SCHWARTZ, K.J.; ALTHOUSE, G.C.; MCGINLEY, M.J.; BREVIK, A.K.

Artificial insemination of gilts with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus-contaminated semen. Swine Health Prod., 2(6): 19-23, 1994.

TERPSTRA, C.; WENSVOORT, G.; POL, J.M.A.

Experimental reproduction of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease) by infection with Lelystad virus: Koch's postulates fulfilled.

Vet. Q., 13: 131-136, 1991.

TUBOLY, S.; BERNATH, S.; GLAVITS, R.; MEDVECZKY, I.

Intestinal absorption of colostral lymphoid cells in newborn piglets.

Vet. Immunol. Immunopathol., 20 (1): 75-85, 1988.

ULYSHEN, T.

AI - How much of a PRRS threat?

Swine Health Prod., 2(6): 24-27, 1994.



VAN ALSTINE, W.G.

Past diagnostic approaches and findings and potentially useful diagnostic strategies.  
Proc. Livest. Conserv. Inst., Mystery Swine Dis. Comm. Meet., 52-58, 1990.

VAN ALSTINE, W.G.

Mystery swine disease in the United States.  
European Comm. Seminar on PRRS, Conf. n° 13, 1991.

VOICU, I.L.; ELAZHARY, Y.M.A.S.; CORNAGLIA, E.

Porcine epidemic abortion and respiratory syndrome virus isolation in Quebec.  
Proc. 73rd Ann. Meet. CRWAD, 65, 1992.

VOICU, I.L.; SILIM, A.; MORIN, M.; ELAZHARY, M.A.S.Y.

Interaction of porcine reproductive and respiratory syndrome virus with swine monocytes.  
Vet. Rec., 134: 422-423, 1994.

WENSVOORT, G.; TERPSTRA, C.; POL, J.M.A.; TER LAAK, E.A.; BLOEMRAAD, M.; DE KLUYVER, E.P.; Kragten, C.; VAN BUITEN, L.; DEN BESTEN, A.; WAGENAAR, F.; BROEKHUIJSEN, J.M.; MOONEN, P.L.J.M.; ZETSTRA, T.; DE BOER, E.A.; TIBBEN, H.J.; DE JONG, M.F.; VANT VELD, P.; GROENLAND, G.J.R.; VAN GENNEP, J.A.; VOETS, M.T.; VERHEIJDEN, J.H.M.; BRAAMSKAMP, J.

Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus.  
Vet. Q., 13: 121-130, 1991.

WENSVOORT, G.; DE KLUYVER, E.P.; POL, J.M.A.; WAGENAAR, F.; MOORMANN, R.J.M.; HULST, M.M.; BLOEMRAAD, R.; DEN BESTEN, A.; ZETSTRA, T.; TERPSTRA, C.

Lelystad virus, the cause of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome: a review of mystery swine disease research at Lelystad.  
Vet. Micro., 33: 185-193, 1992.

WENSVOORT, G.; DE KLUYVER, E.P.; LUIJTZE, E.A.; DEN BESTEN, A.; HARRIS, L.; COLLINS, J.E.; CHRISTIANSON, W.T.; CHLADEK, D.

Antigenic comparison of Lelystad virus and swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus.  
J. Vet. Diagn. Invest., 4(2): 134-138, 1992.

WHITE, M.E.C.

Blue ear disease of pigs.  
Vet. Rec., 128: 574, 1991.

WILLIAMS, P.P.

Immunomodulating effects of intestinal absorbed maternal colostral leukocytes by neonatal pigs.  
Can. J. Vet. Res., 57: 1-8, 1993.

WILLS, R.W.; ZIMMERMAN, J.J.; YOON, K.J.; SWENSON, S.L.; MCGINLEY, M.J.; HILL, H.T.; PLATT, K.B.

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: isolation from chronically infected swine.  
Proc. 26th. Ann. Meet. AASP, 387-389, 1995.

WOOLLEN, N.; DANIELS, E.K.; YEARY, T.; LIEPOLS, H.W.; PHILLIPS, R.M.

Chlamydial infection and perinatal mortality in swine herds.  
J. Am. Vet. Med. Assoc., 197: 600-601, 1990.

YAEGER, M.J.; PRIEVE, T.; COLLINS, J.E.; CHRISTOPHER-HENNINGS, J.; NELSON, E.A.; BENFIELD, D.A.

Evidence for the transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in boar semen.  
Swine Health Prod., 1(5): 7-9, 1993.

YOON, I.J.; JOO, H.S.; CHRISTIANSON, W.T.; KIM, H.S.; COLLINS, J.E.; CARLSON, J.H.; DEE, S.A.  
Isolation of a cytopathic virus from weak pigs on farms with a history of swine infertility and respiratory syndrome.  
J. Vet. Diagn. Invest., 4(2): 139-143, 1992a.

YOON, I.J.; JOO, H.S.; CRHISTIANSON, W.T.; KIM, H.S.; COLLINS, J.E.; MORRISON, R.B.; DIAL, G.D.  
An indirect fluorescent antibody test for the detection of antibody to swine infertility and respiratory virus in swine sera.  
J. Vet. Diagn. Invest., 4(2): 144-147, 1992b.

YOON, I.J.; JOO, H.S.; GOYAL, S.M.; MOLITOR, T.W.  
A modified serum neutralization test for the detection of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome in swine sera.  
J. Vet. Diagn. Invest., 6: 289-293, 1994a.

YOON, K.J.; ZIMMERMAN, J.J.; SWENSON, S.L.; WILLS, R.W.; HILL, H.T.; PLATT, K.B.  
Assessment of the biological significance of antibody dependent enhancement (ADE) of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS) virus infection in passively immunized pigs.  
Proc. 13th. IPVS Congress, 24, 1994b.

ZHOU, Y.; BARGHUSEN, S.; CHOI, C.S.; ROSSOW, K.D.; COLLINS, J.E.; LABER, J.; MOLITOR, T.W.;  
MURTAUGH, M.P.  
Effect of SIRS infection in leucocyte populations in the peripheral blood and on cytokyne expression in alveolar macrophages of growing pigs.  
Am. Assoc. Swine Pract. Newsl., 4: 28, 1992.

ZIMMERMAN, J.; SWENSON, S.L.; WILLS, R.W.; PIRTLE, E.C.; YOON, K.J.; HILL, H.T.; MCGINGLEY, M.J.  
Transmission of PRRS virus.  
Proc. Allen D. Leman Swine Conf., 51-52, 1993.

ZIMMERMAN, J.; WILLS, R.W.; SWENSON, S.L.; PIRTLE, E.C.; YOON, K.J.; HILL, H.T.  
Notes on PRRS virus transmission.  
Proc. 25th Ann. Meet. AASP, 348-349, 1994.

**CAPÍTULO 2:**

**INFECCIÓN POR**  
***Haemophilus parasuis***

## 2.1 INTRODUCCIÓN E HISTORIA

La observación inicial de un pequeño microorganismo gram-negativo asociado a la presencia de serositis y poliartritis en cerdos primero (Glässer, 1910) y el aislamiento de una bacteria *Haemophilus influenzae suis* procedente de cerdos infectados con el virus de Influenza después (Lewis y Shope, 1931) fueron los primeros hallazgos relacionados con un síndrome de serositis-artritis que desde 1910 se había designado como Enfermedad de Glässer. En 1943 se aisló otro microorganismo de un caso con el mismo cuadro lesional anteriormente descrito, el cual, aún coincidiendo con las bacterias años atrás descritas, fué designado como *Haemophilus suis* (Hjärre y Wramby, 1943).

Estudios etiológicos posteriores (Kilian, 1974), a través de una prueba rápida que permite la diferenciación de especies de *Haemophilus* (*H.*), el test de Porfirina, mostraron que los anteriores microorganismos eran realmente *H. parasuis*, y se considera a éste como el agente infeccioso capaz de desarrollar poliserositis y artritis, además de encontrarse de forma apatógena en el tracto respiratorio de cerdos sanos (Nicolet, 1992).

Las bacterias del género *H.* se caracterizan por ser coco-bacilos gram-negativos, encapsulados o no, inmóviles y no esporulados, que forman pequeñas colonias en medios enriquecidos (Rosendal y Boyd, 1985). Estos microorganismos requieren de una serie de factores para su crecimiento (Rosendal y Boyd, 1985; McDaniels y Cairns, 1990):

- \* hemina (factor X de la coagulación)

- \* NAD (nicotinamida adenin-dinucleótido; factor V de la coagulación)

En cultivo de ágar-sangre, el factor X suele obtenerse de la hemoglobina de la sangre del medio y el factor V procede de cultivos de *Staphylococcus aureus* u otras bacterias que lo produzcan, coinoculadas en el substrato. No obstante, también pueden utilizarse hemina pura y NAD junto con el resto de nutrientes con el objeto de realizar caldos de cultivo.

Taxonómicamente, el género *H.* se encuentra entre los miembros dependientes de factor V de la familia *Pasteurellaceae*, junto con los géneros *Pasteurella* y *Actinobacillus* (Moller y Kilian,

1990). Se trata de un género bastante heterogeneo, que incluye distintas especies que se presentan en animales domésticos (Rosendal y Boyd, 1985) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Especies de *Haemophilus* que causan enfermedad en distintas especies animales.

AGENTE	ESPECIE HUESPED	ENFERMEDAD PROVOCADA
<i>H. parasuis</i>	Porcino	Enfermedad de Glasser
<i>H. somnus</i>	Bovino	Meningoencefalitis Tromboembólica
<i>H. agni</i>	Ovino	Septicemia
<i>H. equigenitalis</i>	Equino	Metritis Contagiosa Equina
<i>H. paragallinarum</i>	Aves	Coriza Infecciosa
<i>H. gallinarum</i>	Aves	Coriza Infecciosa

Del cerdo ha sido aislado especialmente *H. parasuis*, pero también unos grupos de *H.* designados como taxón "minor group" y taxón C, desconociéndose de éstos últimos su significado patológico (Kilian et al., 1978). Estudios posteriores de bacterias dependientes de factor V aisladas del tracto respiratorio superior de cerdos revelaron, además, la existencia de 3 taxones con características bioquímicas distintas a los conocidos, y que fueron designados como D, E y F (Moller y Kilian, 1990). De éstos tampoco se ha establecido su significado patológico.

Hasta 1985 también se incluía dentro del género *H.* a la bacteria *Actinobacillus pleuropneumoniae*, de gran importancia como agente patógeno respiratorio del cerdo y causante de un cuadro lesional de pleuroneumonía fibrinosa o fibrino-necrótica. La razón de este cambio de clasificación fue el descubrimiento de que no todas las cepas de *A. pleuropneumoniae* eran factor V dependientes, y de que además tenía una proximidad genética mucho más elevada con *A. lignieresii*, especie tipo del género *Actinobacillus*, que con el resto de representantes del género *H.* (Rosendal y Boyd, 1985).

## 2.2 AGENTE ETIOLÓGICO

Se reconoce a *H. parasuis* como una bacteria pleomórfica, aunque básicamente se presenta como coco o coco-bacilo, gram negativa, ureasa negativa, de longitud variable entre 1-5  $\mu\text{m}$ . y de 0.2-2  $\mu\text{m}$  de ancho, no fimbriado *in vitro* aunque si *in vivo* (Munch et al., 1992). Esta bacteria forma parte de la flora normal de la mucosa nasofaríngea de los cerdos sanos, pero no de los pulmones (Nicolet, 1992).

Laboratorialmente hay una serie de pruebas bioquímicas que definen a este microorganismo. No obstante, son pruebas que no dan información sobre la patogenicidad de *H. parasuis*, dado que si permiten discernir de que especie se trata, pero no que subtipo o serovar se está contemplando. Las pruebas bioquímicas usadas para su caracterización son (Biberstein et al., 1977; Rapp et al., 1985; Eaves et al., 1989; Raßbach, 1992):

- \* Hemolisis: capacidad de destrucción de eritrocitos a través de hemolisinas.
- \* Producción de porfobilinógeno: capacidad de biosintetizar porfobilinógeno y porfirinas a partir de ácido delta-aminolevulínico. Prueba específica del género *H.*
- \* Ureasa: capacidad de producción de urea a partir de nitrógeno proteico.
- \* Oxidasa: presencia de enzimas oxidantes.
- \* Indol: presencia del enzima triptófano reductasa.
- \* Reducción de Nitratos: capacidad de convertir nitratos en nitritos.
- \* Fermentación de azúcares: capacidad de fermentar glucosa, lactosa, sacarosa, manitol, xilosa, ribosa, arabinosa y galactosa.

**Tabla 2.** Principales pruebas bioquímicas utilizadas en el reconocimiento de especie para la bacteria *H. parasuis*.

PRUEBA BIOQUÍMICA	<i>H. parasuis</i>
Hemolisis	negativo
Producción de porfobilinógeno	positivo
Ureasa	negativo
Oxidasa	positivo
Catalasa	positivo
Indol	negativo
Reducción de nitratos	positivo
Glucosa	positivo
Lactosa	negativo
Sacarosa	positivo
Manitol	negativo
Xilosa	negativo
Ribosa	positivo
Arabinosa	negativo
Galactosa	variable

La limitación de las pruebas bioquímicas o enzimáticas estriba en no poder diferenciar entre cepas, hecho de vital importancia, dado que esta misma especie incluye cepas totalmente apatógenas hasta otras que pueden causar la muerte del animal en pocas horas.

Atendiendo a su perfil proteico, a través de una prueba de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), se han podido describir 2 biotipos dentro de la especie *H. parasuis*. Casi todas las cepas obtenidas de animales que sufrían la enfermedad de Glässer pertenecieron al llamado biotipo II, mientras que el biotipo I incluía la mayoría de cepas que se aislaron de cerdos totalmente sanos como flora saprófita. De esta manera, se sugirió una muy clara correlación entre el patrón peptídico y la patogenicidad de las cepas (Morozumi y Nicolet, 1986a).

Una modificación de la técnica anterior consistió en la realización de un perfil proteico con las proteínas de membrana externas (OMPs): se rompen las células por sonicación, se separan las fracciones de membrana de la célula con sarcosinato sodico lauroilo, se ultracentrifugan y se

realiza una separación continua con SDS-PAGE. A través de este procedimiento se han detectado hasta 18 patrones proteicos distintos, pero no se encontró correlación entre patogenicidad y perfil de OMPs (Rapp et al., 1986).

No obstante, la clasificación en biotipo I y II ha resultado bastante obsoleta, en parte por el hecho de que dentro del mismo biotipo II las diferencias de patogenicidad según cepa son también muy marcadas y por la aparición de nuevas técnicas que permitían diferenciar cepas a través de antisueros policlonales (serotipificación). Inicialmente se aceptó una clasificación que contenía 7 serovares distintos (Nicolet et al., 1980; Morozumi y Nicolet, 1986), atendiendo a la reacción con antisueros policlonales de conejo en el test de aglutinación sobre portaobjetos, test de aglutinación en tubo y test de precipitación en gel de ágar (AGPT). Recientemente se realizó una nueva clasificación atendiendo exclusivamente a la reacción al AGPT, considerándose suficientemente sensible y específica, describiéndose hasta 15 serovares distintos, que son los que actualmente están en vigor, y que sí permiten establecer una clasificación en relación a la patogenicidad (Kielstein y Rapp-Gabrielson, 1992; Rapp-Gabrielson et al., 1992a; Rapp-Gabrielson y Gabrielson, 1992).

### 2.3 EPIDEMIOLOGÍA

La enfermedad de Glässer, causada por *H. parasuis*, es una enfermedad de distribución mundial pero que suele presentarse esporádicamente, limitándose a pocas granjas y con un nivel de morbilidad muy variable por granja (Nicolet, 1992). Se acepta que la morbilidad general de esta enfermedad es baja pero, últimamente, y después de las epizootias mundiales (especialmente en Europa y Norte América) de PRRS, se asume que la mortalidad puede ser bastante más elevada, llegando incluso a un 50% de los animales de la granja (Collins y Rossow, 1993). En este caso, la evidencia de campo sugiere que el PRRSv ha contribuido de forma considerable al aumento de la incidencia de enfermedad de Glässer (Vahle et al., 1994).

Tradicionalmente, esta enfermedad se relaciona con condiciones estresantes de los cerdos y básicamente afecta a animales entre 1 y 4 meses de edad (fases de transición, e inicio y mediados de engorde), pero especialmente a lechones entre 5 y 8 semanas (Nielsen y



Danielson, 1975). En granjas de alta sanidad y SPF este proceso puede, en algunos casos, desarrollarse en animales de cualquier edad, incluyendo adultos, y sin necesidad de situaciones de estrés (Menard y Moore, 1990).

*H. parasuis* ha sido frecuentemente aislado de lesiones neumónicas tipo neumonía enzoótica, sugiriéndose que actúa como microorganismo oportunista que causa lesión pulmonar en asociación con otros virus, bacterias o micoplasmas (Nicolet, 1992; Collins y Rossow, 1993; Narita et al., 1994).

En cuanto a los estudios epidemiológicos efectuados hasta el momento cabe destacar que no se refieren a la existencia de una enfermedad concreta con un tipo de cuadro clínico y lesional específico, sino que se han basado en la detección de su agente etiológico, *H. parasuis*, o de anticuerpos contra este, del cual algunos serovares sí pueden causar la enfermedad pero otros son totalmente inocuos y se pueden encontrar en el tracto respiratorio superior de cerdos sanos (Nicolet et al., 1992). El tipo de estudios epidemiológicos que pueden dar una idea indirecta sobre la incidencia de la enfermedad son aquellos que han estudiado la prevalencia de los distintos serotipos en zonas geográficas concretas (Kielstein y Rapp-Gabrielson, 1992; Rapp-Gabrielson y Gabrielson, 1992).

De los estudios sobre la detección de *H. parasuis* o sus anticuerpos cabe diferenciar aquellos realizados sobre cerdos en granja (Smart et al., 1988; Kruger et al., 1993) y en matadero (Pijoan et al., 1983; Mousing et al., 1990; Moller et al., 1993), demostrando ambos que la prevalencia de este microorganismo en la cabaña porcina es muy elevada.

A nivel de granja se mostró que se puede aislar *H. parasuis* de la cavidad nasal hasta en un 32% de los animales de muchas granjas, si bien el 85% de estos aislamientos corresponden a serovares no patógenos (Kruger et al., 1993). Por otro lado, el estudio de los patrones de fragmentos de DNA de las cepas aisladas, obtenidas mediante endonucleasas de restricción, indica infecciones individuales con una única cepa, aunque en una misma granja podían coexistir distintas cepas o patrones de DNA, aunque solo una o dos solían ser las predominantes (Smart et al., 1988).

Los resultados a nivel de matadero fueron similares a los muestreos de animales de granja, dado que se logró aislamiento de *H. parasuis* en cavidad nasal en aproximadamente el 30% de los animales sacrificados (Moller et al., 1993). Por contra, los aislamientos de la bacteria en pulmón o tonsila suponían un porcentaje muy bajo, no llegando a más del 1% (Moller et al., 1993) o 2% (Pijoan et al., 1983). También en matadero se ha observado que entre el 40 y el 85% de los animales sacrificados son serológicamente positivos a *H. parasuis* (Mousing et al., 1990; Moller et al., 1993), y que la correlación entre aislamiento y serología es bajo, ya que solo se pudo aislar la bacteria del 30% de los animales seropositivos. Este dato es comprensible por el hecho de que, en caso de sufrir enfermedad, la mayoría de los animales la sufren entre las 8 y 12 semanas, de que existen muchos serovares apatógenos y que las técnicas de aislamiento no son de gran sensibilidad (Moller et al., 1993).

Los estudios relacionados con la distribución de serovares en distintos países son escasos, debido, probablemente, a la reciente nueva clasificación de *H. parasuis* en 15 serovares y al hecho de que su serotipificación por AGPT es relativamente de baja disponibilidad laboratorial. La mayoría de estos estudios han sido realizados en Alemania y Norteamérica, obteniendo los resultados mostrados en la Tabla 3 (Kielstein y Rapp-Gabrielson, 1992; Rapp-Gabrielson y Gabrielson, 1992).

A través de estos estudios se concluyó que los serovares 4 y 5, de marcada patogenicidad, especialmente el 5, son probablemente los serovares de mayor prevalencia, destacando el importante número de serovares patógenos en Estados Unidos, incluyendo el 12, 13 y 14. Otros datos también indican que los serovares 5 y 2 son los de mayor prevalencia en Australia, y el 4 y 13 son los de mayor prevalencia en Brasil (Rapp-Gabrielson y Gabrielson, 1992).

Otro de los factores más importantes que hay que tener en cuenta y que pueden jugar un papel fundamental en la epidemiología de esta enfermedad es el hecho de diferenciar entre animales infectados y animales colonizados. En el primer caso se designan a aquellos animales que padecen enfermedad causada por *H. parasuis*, probablemente por la ausencia de inmunidad protectora, mientras que los segundos presentan al microorganismo, usualmente en la cavidad nasal, pero no obstante se encuentran inmunológicamente protegidos (Pijoan, 1995).

A pesar de los diversos estudios de prevalencia de este microorganismo, se conoce muy poco en lo referente a su transmisión. Se acepta que la transmisión usual de *H. parasuis* es horizontal de cerdo a cerdo, pero se han sugerido otras posibles vías (Menard y Moore, 1990). Por ejemplo, en Ontario (Canadá) se aisló *H. parasuis* de la cavidad nasal de cerdos de algunas granjas SPF formadas por animales procedentes de cesarea en los últimos 4 años y sin haber introducido ningún tipo de animal vivo durante ese período de tiempo. Se sugirió que el aire podría haber sido la vía de transmisión en este caso (Smart et al., 1989).

Tabla 3. Prevalencia de los distintos serovares de *H. parasuis* aislados en Alemania y Norteamérica.

SEROTIPO	ALEMANIA	ESTADOS UNIDOS	CANADA
1	4.1%	1.9%	2.4%
2	5.5%	11.2%	3.9%
3	1.4%	1.0%	1.4%
4	17.2%	14.5%	17.2%
5	23.8%	13.0%	33.3%
6	1.7%	0%	0.8%
7	2.1%	4.3%	2.4%
8	0%	0%	0%
9	4.1%	2.5%	0%
10	2.4%	1.9%	0.6%
11	2.4%	1.8%	0%
12	2.8%	11.2%	2%
13	4.5%	12.1%	9.2%
14	1.7%	12.1%	5.5%
15	0.7%	0.8%	0%
NT	26.2%	11.7%	21.3%
Total Aislamientos	290	122	119

Las observaciones sobre transmisión del microorganismo entre animales seropositivos y animales seronegativos sugieren la existencia de 2 patrones de infección (Nielsen, 1980). Un primer patrón de transmisión supone la introducción de *H. parasuis* en una granja libre de este patógeno. En este caso se inicia un brote epizootico de la enfermedad que empieza entre 1 y

14 días después de la introducción de la bacteria. Inicialmente se observan cerdos afectados súbitamente, que suelen morir sin lesiones aparentes, aunque en algunos casos la consistencia friable de riñones, hígado y bazo, y las hemorragias en intestino pueden ser las únicas lesiones presentes. Los casos de infección posterior en la granja ya se suelen manifestar con las características lesiones macroscópicas de enfermedad de Glässer. Un segundo patrón ocurriría en los casos en que animales libres de *H. parasuis* procedentes de granjas de alta sanidad son introducidos en granjas convencionales. En este caso, solo los cerdos introducidos sufrirían enfermedad, dado que serían inmunológicamente vírgenes frente a esta bacteria. En otros casos, cuando la granja se encuentra enzoóticamente infectada y la presión de infección es baja, la inmunidad activa contra *H. parasuis* no se desarrolla hasta las 4 o 5 semanas, de manera que los animales son susceptibles a padecer la enfermedad antes de alcanzar esa edad.

## 2.4 SÍNTOMAS CLÍNICOS

En este apartado sería conveniente destacar la diferencia entre los que se considerarían síntomas clínicos debidos a la enfermedad de Glässer (término que designa una entidad clínica que patológicamente se define como una poliserositis fibrinosa o fibrino-purulenta) y los debidos a la infección por la bacteria *H. parasuis*.

La infección por *H. parasuis* puede cursar con varios cuadros clínico-patológicos que incluirían (Hoefling, 1994):

- \* poliserositis fibrinosa o enfermedad de Glässer
- \* septicemia sin lesiones de poliserositis
- \* miositis aguda de músculos maseteros
- \* alteraciones respiratorias

### 2.4.1 Poliserositis fibrinosa o enfermedad de Glässer

Esta entidad se caracteriza por una presentación súbita de signos clínicos, afectando a unos pocos animales de la granja, básicamente a los de edad comprendida entre 5 y 12 semanas. El

curso de la enfermedad es agudo o sobreagudo, siendo en muchos casos los animales más pesados de la piara los afectados (Nielsen y Danielson, 1975; Nicolet, 1992).

Estos síntomas suelen ser hipertermia, con rango entre 40.5 y 42°C, seguido de inapetencia, apatía y anorexia. En muchos casos se produce un fallo de la circulación periférica y es posible la observación de áreas cianóticas en la piel (especialmente orejas, hocico y abdomen). El edema subcutáneo en orejas y párpados es también un hallazgo posible, acompañándose de enrojecimiento de la conjuntiva ocular. La respiración suele ser normal, pero en algunos casos se observa disnea, descarga nasal serosa y taquicardia. Los animales afectados suelen ser reticentes al movimiento o caminan muy despacio y, en muchos casos, se aprecia un abultamiento de alguna o de casi todas las articulaciones de las extremidades, especialmente carpales y tarsales, siendo blandas y dolorosas al tacto. En algunos brotes epizoóticos aparecen animales con síntomas nerviosos de origen central sugestivos de meningitis, con temblor muscular, incoordinación, postración, pedaleo, opistótonos, imposibilidad de levantarse y convulsiones. En algunos casos se ha observado muerte súbita sin ningún tipo de síntoma previo (Neil et al., 1969; Nielsen y Danielson, 1975; Riley et al., 1977; Kobish et al., 1980; Madsen, 1984; McDaniels y Cairns, 1990; Menard y Moore, 1990; Nicolet, 1992; Vahle et al., 1994).

La aparición en los últimos años de técnicas de destete temprano medicado y modificaciones de éstas han supuesto la obtención de cerdos inmunológicamente vírgenes contra *H. parasuis* y, por tanto, altamente susceptibles a padecer enfermedad de Glässer en caso de entrar en contacto con portadores asintomáticos (Wiseman et al., 1989; Kirk Clark et al., 1994). Esto ha supuesto un cambio tanto en la epidemiología como en la clínica y el cuadro lesional de esta enfermedad. En estos casos, los animales susceptibles pueden ser de cualquier edad, incluso adultos, pasando a ser una enfermedad altamente contagiosa y de mortalidad variable entre el 15 y 75% de los cerdos afectados. Los síntomas que predominan son fiebre, tos en cerdas, cojeras, inflamación de articulaciones, síntomas nerviosos y muerte súbita, siendo el patrón típico de poliserositis un cuadro lesional inconstante y tardío relativamente al resto de síntomas (Menard y Moore, 1990).

#### **2.4.2 Septicemia sin lesiones de poliserositis**

Los casos en los cuales no se observa el típico cuadro lesional pueden ser debidos a que el proceso se encuentre en una fase previa o inicial a la enfermedad de Glässer. En este caso se observan muertes súbitas en la granja, y en la mayoría de los casos el microorganismo podría ser aislado de distintos puntos del animal (Nielsen, 1980). Estos casos suelen mostrar lesiones macroscópicas mínimas (hemorragias petequiales en algunos órganos) y lesiones microscópicas en varios órganos asociadas a septicemia, con aislamiento de *H. parasuis*.

La literatura muestra un caso en el cual no se apreció la evolución a poliserositis fibrinosa y los intentos de reproducir la septicemia con el aislamiento inicial en animales convencionales de 8 semanas de edad no dieron ningún resultado positivo (Peet et al., 1983).

#### **2.4.3 Miositis aguda de músculos maseteros**

Esta forma de la enfermedad ha sido descrita una única vez. Se caracterizó por afectar a cerdas primerizas de una granja SPF con signos clínicos de hipertermia (41-42°C), inapetencia, debilidad, ataxia, cabeza hinchada, blanda y con extensas áreas de cianosis. Siete de 30 cerdas afectadas por este proceso murieron en un período no superior a 48 horas desde el inicio de los síntomas, y el único resultado positivo de diagnóstico fué el aislamiento de *H. parasuis* (Hoefling, 1991).

#### **2.4.4 Alteraciones respiratorias**

Cuadros respiratorios consistentes en tos y disnea no asociados a enfermedad de Glässer han sido descritos acompañados del aislamiento de *H. parasuis* de los pulmones. No obstante, se considera a este microorganismo como un agente bacteriano secundario que puede actuar asociado a otros agentes (Little, 1970; Nicolet, 1992; Narita et al., 1994).

### **2.5 LESIONES**

Las lesiones macroscópicas que caracterizan la enfermedad de Glässer son la poliserositis y poliartrosis fibrino-purulenta. La bronconeumonía catarral-purulenta aparece también con gran

frecuencia en las infecciones por *H. parasuis* (Neil et al., 1969; Little, 1970; Riley et al., 1977; Kobish et al., 1980; Madsen, 1984; Nascimento y Fagundes, 1991; Nicolet, 1992; Pohle, 1992; Vahle et al., 1994).

Aparte de lesiones en serosas, articulaciones y pulmón, también han sido descritas otras alteraciones en músculos maseteros (Hoefling, 1991) y riñón (Riley et al., 1977; Peet et al., 1983).

A continuación se detallan las lesiones macro y microscópicas que pueden encontrarse en distintos órganos, teniendo en cuenta que en un mismo animal pueden estar presentes casi todas ellas o solo algunas o, en algunos casos, solo una.

### 2.5.1 Pulmón y pleura

La lesión macroscópica en la pleura se caracteriza por una inflamación serofibrinosa (habitualmente más fibrinosa que serosa). La fibrina se dispone como membranas o capas que pueden llegar a recubrir todo el pulmón mostrando un color amarillento o amarillo-grisáceo. Aunque este exudado puede presentar un aspecto muy seco, en muchos casos se acompaña de considerables volúmenes de líquido serofibrinoso amarillento en la cavidad torácica (Palmer, 1991). Microscópicamente se observa la deposición de fibrina en la pleura con grandes cantidades de infiltrado inflamatorio mixto caracterizado por la presencia de linfocitos, macrófagos y neutrófilos. Este tipo de lesión puede ser vista ya en un intervalo de 38-84 horas PI (Vahle et al., 1994). La infección experimental con *H. parasuis* ha revelado prevalencias oscilantes de pleuritis fibrinosa en los animales inoculados, moviéndose entre rangos del 50% y el 90% (Pöhle et al., 1992; Vahle et al., 1994).

Muchos estudios han relacionado directa o indirectamente la presencia de *H. parasuis* en pulmón como causante de consolidación craneo-ventral que microscópicamente se define como bronconeumonía catarral-purulenta y, en los casos más graves, fibrino-hemorrágica (Dungworth, 1991; Pöhle et al., 1992). No obstante, en infecciones experimentales el hallazgo de esta lesión ha sido algo inconstante, pasando desde el 0% (Vahle et al., 1994) hasta el 77% (Pöhle et al., 1992) de los animales infectados. En este último caso se correlacionó directamente la dosis de bacteria inoculada con el tipo y localización de cambios neumónicos;

en algunos casos, la bronconeumonía podía presentarse como lesión única (Pöhle et al. 1992). Otros autores han correlacionado la vía de inoculación del microorganismo con la presencia de neumonía, de manera que animales inoculados intraperitonealmente tenían mucho menor grado de lesión que animales inoculados intranasalmente (Nascimento y Fagundes, 1991). La aparición de edemá pulmonar también ha sido descrita en las infecciones por *H. parasuis* (Riley et al., 1977).

### **2.5.2 Corazón y pericardio**

La infección por *H. parasuis* en animales susceptibles suele causar la deposición de un exudado fibrinoso o fibrino-purulento en la superficie pericárdica, provocando un considerable aumento de su grosor. La presencia de adherencias fibrinosas y/o fibrosas con la superficie pleural son muy frecuentes (Palmer, 1991; Nicolet, 1992; Pöhle et al., 1992). En un estudio realizado con la infección experimental de 118 cerdos de 6-7 semanas de edad, la pericarditis fué descrita en un 36% de los animales (Pöhle et al., 1992).

También se han descrito, en un solo caso, la presencia de equimosis y petequias en epi y endocardio (Riley et al., 1977).

### **2.5.3 Hígado, bazo, estómago, intestinos y mesenterio**

La inflamación serosa o serofibrinosa de la cápsula del hígado, del bazo, de la serosa intestinal y del mesenterio se suele designar genéricamente como peritonitis fibrinosa o serofibrinosa, aunque en el caso del hígado y del bazo se puedan llamar específicamente perihepatitis y periesplenitis, respectivamente (Kobish et al., 1980; Nicolet, 1992). La fibrina presente en la superficie de estos órganos tiene las mismas características macro y microscópicas descritas en la pleuritis, y se considera un hallazgo relativamente frecuente en un 36% de los casos de infección por *H. parasuis* (Pöhle et al., 1992).

La prevalencia de peritonitis en infecciones por este microorganismo también se ha correlacionado con la vía de infección; en caso de inoculación vía intraperitoneal, se observa mayor porcentaje de animales con peritonitis (Nascimento y Fagundes, 1991).



También se ha descrito una apariencia friable y congestiva del hígado, congestión del bazo, fundus gástrico frecuentemente infartado o congestivo, y mucosa del intestino delgado congestiva y, frecuentemente, con sangre en el lumen (Riley et al., 1977; Palmer, 1991).

#### 2.5.4 Articulaciones

Usualmente son más de una las articulaciones afectadas y preferentemente las de los carpos, tarsos y atlanto-occipital. Se trata de artritis y periartitis fibrinosa o fibrino-purulenta, con marcada presencia de fibrina depositada en superficies articulares y aumento del volumen de líquido sinovial, el cual se muestra menos viscoso de lo habitual. El tejido periarticular suele presentar-se-distendido y edematoso (Riley et al., 1977; Palmer, 1991; Nicolet, 1992).

#### 2.5.5 Cerebro y meninges

Se considera que las meninges son una de las serosas más afectadas en esta enfermedad, llegando, en algunos casos, a ser un hallazgo en casi el 80% de los animales infectados por *H. parasuis* (Palmer, 1991).

En casos muy severos se puede apreciar macroscópicamente una ligera opacidad de las meninges que cubren el cerebelo y área occipital del cerebro. Histológicamente el exudado inflamatorio, en la mayoría de los casos afectando casi solo el cerebro y no la médula espinal, suele ser más obvio en las meninges basales, pero también en los surcos entre circunvoluciones en caso de mayor cantidad de depósito de exudado inflamatorio fibrino-purulento. En la mayoría de los casos se aprecia un aumento del volumen de líquido cefalorraquídeo, caracterizado por una tonalidad blanquecina y opaca, causada por la presencia de leucocitos (Riley et al., 1977; Palmer, 1991).

A nivel cerebral también ha sido descrita una meningo-encefalitis trombótica caracterizada por un prominente depósito de fibrina en las meninges, así como en los vasos sanguíneos. En otros casos, un edema meníngeo moderado ha sido la única lesión hallada en sistema nervioso central (Riley et al., 1977).

### **2.5.6 Riñón**

La lesión renal, en caso de haberla, es un claro indicador de septicemia, y se caracteriza por la presencia de hemorragias petequiales en el córtex renal y, en algunos casos, apariencia friable del riñón y congestión de la médula renal. Histológicamente se puede observar trombosis glomerular que interesa tanto a arteriola aferente como eferente. Estos trombos reaccionan positivamente a tinciones de fibrina (Riley et al., 1977; Peet et al., 1983; Palmer, 1991).

### **2.5.7 Otros órganos**

**Ganglios linfáticos:** Se ha descrito la presencia de congestión (Riley et al., 1977).

**Piel y tejido subcutáneo:** Se ha descrito casos de trombosis en vasos de la papilas dérmicas de la piel (Riley et al., 1977; Palmer, 1991) y edema y cianosis subcutánea (McDaniels y Cairns, 1991; Hoefling, 1991).

**Músculos Maseteros:** Se ha constatado esporádicamente la presencia de exudado serofibrinoso conteniendo elevado número de neutrófilos, linfocitos y macrófagos en la fascia de los músculos maseteros y en grasa subcutánea, extendiéndose en el peri y endomisio de los citados músculos (miositis) (Hoefling, 1991).

## **2.6 PATOGENICIDAD Y PATOGENIA**

Aunque la enfermedad de Glässer sea una entidad clínico-patológica conocida desde hace casi un siglo, su patogenia se desconoce en gran medida.

La relación entre la capacidad patógena o virulencia y el serovar ha sido uno de los aspectos más estudiados (Von Rosner et al., 1991; Kielstein y Rapp-Gabrielson, 1992; Kielstein et al., 1992; Rapp-Gabrielson et al., 1992b; Nielsen, 1993; Kielstein et al., 1994). Esta relación ha sido estudiada bajo distintos puntos de vista, incluyendo lugar de aislamiento, acción sobre cerdos libres de patógenos específicos (cerdos SPF), y acción sobre cobayas. La localización de aislamiento puede ser de vital importancia, dado que algunos serovares solo se aíslan de algunas zonas, como de la mucosa nasal, donde probablemente se encuentran saprofiticamente, mientras que otros se aíslan de pulmón y otras localizaciones sistémicas, donde,

probablemente, son causa de enfermedad (Kielstein y Rapp-Gabrielson, 1992). El efecto sobre cerdos SPF y cobayas, animales especialmente sensibles a la infección por *H. parasuis*, es valorado teniendo en cuenta el cuadro clínico generado, considerándose de mayor virulencia aquellos serovares que causaban sintomatología de mayor severidad (Kielstein y Rapp-Gabrielson, 1992; Rapp-Gabrielson et al., 1992b). Según los tres aspectos comentados, se estableció una relación virulencia-serovar (Tabla 4).

**Tabla 4.** Niveles de virulencia asociados a los distintos serovares de *H. parasuis* según estudios de aislamiento, acción sobre cerdos SPF y acción sobre cobayas.

VIRULENCIA	SEROVARES
+++ (alta)	5
++ (media)	1, 10, 12, 13, 14
+ (baja)	2, 4, 15
+/- (muy baja)	8
- (nula)	3, 6, 7, 9, 11

Las diferencias de patogenicidad o virulencia han sido tradicionalmente asociadas a la presencia de cápsula (Morozumi y Nicolet, 1986b), OMPs (Rapp et al., 1986), perfiles proteicos o perfiles proteicos de células enteras (Morozumi y Nicolet, 1986a), pero en ningún caso ha sido demostrado consistentemente que las diferencias de patogenicidad se relacionen con estos factores.

Otros componentes que se han sugerido como posibles factores de virulencia serían la presencia de proteínas de membrana restringidas o reguladas por hierro (IROMPs). En condiciones *in vivo*, *H. parasuis* produce sideroforos que secuestran hierro (necesario para su multiplicación) de la transferrina sérica, los cuales se unirían a las IROMPs, que actuarían como receptores y permitirían la incorporación de hierro al interior celular. Concretamente se ha determinado la expresión de al menos 3 IROMPs, con pesos moleculares de 74, 82 y 100 kdal, en *H. parasuis* (Morton y Williams, 1989). Las IROMPs han sido descritas también en bacterias dependientes de factor V de la familia *Pasteurellaceae*, concretamente en *Pasteurella multocida* en aves (Choi-Kim et al., 1991) y en cerdos (Zhao et al., 1995). Estas proteínas no serían expresadas en condiciones *in vitro* dado que los medios de cultivo suelen contener

cantidades considerables de hierro libre, mientras que si serían expresadas en medios de cultivo selectivos restringidos en hierro (Choi et al., 1989). Ello supone que la infección *in vivo* permitiría desarrollar anticuerpos anti-IROMPs, los cuales han resultado ser protectivos contra la infección en algunos estudios (Choi-Kim et al., 1991). No obstante, el papel real de la patogenicidad de las IROMPs en caso de *H. parasuis* no ha sido aún clarificado.

Experimentalmente se han realizado distintos estudios con el objeto de reproducir la enfermedad y estudiar su patogenia. En ellos hay una cierta variabilidad de origen de los animales utilizados (cerdos gnotobióticos, SPF y procedentes de destete precoz medicado), pero el denominador común en todos estos trabajos fué el hecho de utilizar animales con un mínimo de carga bacteriana y la posibilidad de que no hayan entrado en contacto con la bacteria anteriormente al experimento. Con ello se ha podido reproducir experimentalmente la enfermedad inoculando *H. parasuis* via intranasal (Riley et al., 1977; Nascimento y Fagundes, 1991; Kielstein et al., 1994; Vahle et al., 1994), intratraqueal (Neil et al., 1969; Riley et al., 1977; Pohle et al., 1992; Kielstein et al., 1994), intraperitoneal (Riley et al., 1977; Nascimento y Fagundes, 1991; Kielstein y Rapp-Gabrielson, 1992; Pöhle et al., 1992; Kielstein et al., 1994) e intravenosa (Kielstein et al., 1994). Los resultados de la mayoría de estas infecciones mostraron que la extensión de las lesiones así como el tipo de serosas especialmente afectadas eran valores dependientes de la dosis y vía de inoculación. Un estudio demostró que el grado de lesión pulmonar (bronconeumonía catarral-purulenta) si era dependiente de la dosis de inoculación, pero no la extensión de la serositis fibrinosa (Pöhle et al. 1992).

Igualmente, estos estudios mostraron que el componente neumotrópico de *H. parasuis* aparece casi exclusivamente en aquellos casos donde la inoculación fue intranasal o intratraqueal (Riley et al., 1977; Nascimento y Fagundes, 1991; Pohle et al., 1992; Kielstein et al., 1994).

La aparición de síntomas clínicos varía según vía de inoculación, pero pueden apreciarse desde las 72 horas PI. En caso de utilizar dosis elevadas de bacteria ( $>10^7$  UFC/ml), los síntomas clínicos pueden desarrollarse en 24 horas (Vahle et al., 1994).

La rinitis observada experimentalmente, de moderada a intensa desde las 12 horas PI (Vahle et al., 1994) y los datos procedentes de estudios de matadero, en los cuales el 98% de los

aislamientos de *H. parasuis* realizados correspondieron a muestras de hisopos nasales (Moller et al., 1993), sugieren que la mucosa nasal es el punto inicial de colonización bacteriana. Tras la colonización nasal, es necesaria la entrada a circulación sanguínea para poder producir lesión en distintos puntos del organismo. Este hecho se confirma por el aislamiento de *H. parasuis* en sangre ya antes de las 36 horas PI (Vahle et al., 1994). Posteriormente la bacteria se multiplica en superficies serosas como la pleura, pericardio, peritoneo, sinovias articulares y meninges, causando las típicas lesiones de poliserositis fibrino-purulenta y poliartritis. Aunque la multiplicación se produzca en múltiples puntos, la recuperación de la bacteria suele ser esporádica, probablemente debido a la dificultad del cultivo laboratorial (Vahle et al., 1995).

Uno de los principales interrogantes sobre la patogenia de *H. parasuis* es como logra la bacteria colonizar la mucosa respiratoria y que eventos se producen para que pueda pasar al torrente circulatorio. En la patogenia de infecciones por algunas especies del género *Haemophilus*, la adhesión del agente patógeno a la superficie de células epiteliales es una condición esencial para la colonización y posterior invasión de los tejidos (Stephens y Farley, 1991; Munch et al., 1992). Mediante estudios de microscopía electrónica se ha descrito la expresión en condiciones de cultivo *in vivo*, por parte de *H. parasuis*, de unos filamentos conocidos con el nombre de fimbrias, los cuales no son expresados en condiciones de cultivo *in vitro* (Munch et al., 1992). Se ha sugerido que estas fimbrias puedan facilitar la adhesión inicial del microorganismo a la superficie de las células epiteliales, tal como ya se ha descrito en *H. influenzae* tipo b, causante de graves septicemias en la especie humana, especialmente en niños (Van Alphen et al., 1988; Farley et al., 1990).

En el caso de *H. influenzae* tipo b se ha sugerido que el esquema patogénico consiste en la inhalación de la bacteria, asociación al mucus del tracto respiratorio, citotoxicidad consistente en pérdida de uniones entre células epiteliales, pérdida de cilios y ciliostasis, adhesión selectiva a células epiteliales no ciliadas, multiplicación y formación de microcolonias en la superficie epitelial, invasión del epitelio por una vía intercelular y paso de la bacteria a submucosa que, por extensión, supondría el paso a circulación general provocando bacteriemia (Stephens y Farley, 1991; Moxon y Wilson, 1991).

El paralelismo entre *H. parasuis* y *H. influenzae* tipo b se basaría en el hecho de poseer ambas fimbrias, paso previo a la colonización del epitelio del tracto respiratorio, pero hasta el momento no se ha realizado ningún tipo de estudio que haya relacionado la presencia de fimbrias con la capacidad patogénica de *H. parasuis in vivo* o serotipo. No obstante, contrariamente a *H. influenzae* tipo b (Moxon y Wilson, 1991), en *H. parasuis* no hay correlación entre la presencia de cápsula y virulencia del serotipo (Rapp-Gabrielson y Gabrielson, 1992).

Otra de las primeras líneas de defensa contra los agentes patógenos que penetran en el organismo vía inhalatoria la forman los macrófagos alveolares pulmonares, los cuales, por sus características fagocíticas protegen al organismo contra la invasión bacteriana, produciendo además citoquinas como IL-1 que intensifican la reacción inflamatoria del hospedador por estimulación de linfocitos T (Kessinger et al., 1987). También los macrófagos intravasculares pulmonares, adheridos a la superficie endotelial de capilares pulmonares, son un punto de defensa central en las infecciones de bacterias, especialmente gram-negativas, gracias a la posibilidad de fagocitar y lisar a éstas, procediendo a su eliminación del tracto respiratorio (Chitko-McKown et al., 1991). Por ello, la alteración de alguna de estas poblaciones macrofágicas, podría suponer la facilitación de entrada y diseminación de agentes patógenos, causando septicemia.

## 2.7 DIAGNÓSTICO

Tradicionalmente, la enfermedad de Glässer ha sido diagnosticada a través de las típicas lesiones de poliserositis y poliartritis fibrino-purulentas y el posterior aislamiento de *H. parasuis* de fluidos asociados a estas lesiones o de los propios órganos afectados (Nicolet, 1992; McDaniels y Cairns, 1991). No obstante, también es sabido que la infección por este microorganismo puede presentarse con otros cuadros lesionales, de manera que, en muchos casos, no se intentaría aislar específicamente esta bacteria, y el diagnóstico etiológico no sería posible; este hecho supondría una infravaloración bastante marcada de la presencia real de *H. parasuis* como agente patológico (Peet et al., 1983; Hoefling et al., 1991). En otros casos, el diagnóstico de enfermedad de Glässer por las lesiones macroscópicas observadas puede

sobrevalorar la presencia de *H. parasuis*, dado que existen otras enfermedades que cursan con el mismo tipo de lesiones macroscópicas (Nicolet, 1992).

De todas maneras, actualmente se acepta que el diagnóstico de enfermedad de Glässer se puede realizar basándose en la historia clínica, síntomas y lesiones, por detección de antígeno y por detección de anticuerpos.

### **2.7.1 Historia clínica, síntomas y lesiones**

La coincidencia de aspectos de manejo como la mezcla de animales de distinto origen (y consecuentemente de niveles inmunitarios y de colonización por *H. parasuis* muy variables), síntomas clínicos más o menos inespecíficos pero que incluyen fiebre, inapetencia, letargia, síntomas nerviosos centrales, depauperamiento progresivo de los animales y muertes súbitas, y presencia de lesiones de poliserositis y/o poliartritis fibrinosa o fibrino-purulenta en algunos de los animales necropsiados, son una serie de hallazgos que orientan al diagnóstico de enfermedad de Glässer (McDaniels y Cairns, 1991; Nicolet, 1992; Vahle et al., 1994; Vahle et al., 1995).

A pesar de ello, algunas infecciones sistémicas como poliserositis por *Streptococcus suis* o *Mycoplasma hyorhinis* pueden confundir este diagnóstico, de manera que se recomienda que en todos los casos se intente realizar alguna técnica de detección de antígeno (Nicolet, 1992).

### **2.7.2 Detección de antígeno**

A este nivel se contemplan básicamente 2 tipos de técnicas: aislamiento bacteriano e inmunocitoquímica sobre tejido fijado en formol e incluido en parafina. La gran ventaja de realizar el aislamiento bacteriano es la posibilidad de que posteriormente se pueden aplicar una serie de técnicas laboratoriales que permiten caracterizar serotipo o patrón proteico de esta bacteria y relacionarlo con su capacidad patógena.

El aislamiento bacteriano se suele realizar a partir de líquidos de cavidades corporales (líquido cefalorraquídeo, peritoneal, torácico, pericárdico y articular), hisopos nasales y traqueales, y tejido pulmonar, pero no se considera una prueba de muy alta sensibilidad, dado que el microorganismo es bastante difícil de aislar y, aún en casos experimentales acompañados

de poliserositis y otras lesiones típicas, en algunos casos no se logra el aislamiento (Neil et al., 1969; Riley et al., 1977; Nicolet, 1991; Vahle et al., 1995).

Los medios utilizados para este aislamiento suelen ser (Pijoan et al., 1983; Rapp et al., 1985; Moller et al., 1993):

- \* ágar-triptosa conteniendo el 5% de sangre desfibrinada de caballo (ágar-sangre).
- \* medio selectivo de Gilbride & Rosendal, el cual contiene ágar-tripticasa-soy, 5% de sangre desfibrinada de caballo, 1 µg de cristal violeta por ml., 1 µg. de lincomicina por ml., 128 µg. de bacitracina por ml. y 100 µg. de NAD por ml.
- \* caldo de BHI (infusión de corazón y cerebro) conteniendo 5% de suero de caballo, 5% de extracto de levadura, 0.5 µg/ml de lincomicina, 1.5 µg/ml de bacitracina y 100 µg/ml de NAD.
- \* M96, medio de micoplasmas conteniendo 128 µg/ml de bacitracina.

El cultivo no selectivo de ágar-sangre debe realizarse con la siembra concomitante de una línea de alguna especie de *Staphylococcus* (usualmente *S. aureus*), con la función de aporte de NAD. Este primer aislamiento se realiza a temperatura de 37°C en una atmósfera de 5% de dióxido de carbono y dejando un período de incubación entre 24 y 48 horas. En caso de crecimiento positivo, se aprecian unas colonias no mucosas a ambos lados de la estría de *S. aureus* de un tamaño muy pequeño (entre 0.2 y 1 mm).

El resto de medios de cultivo se trata de caldos enriquecidos y selectivos, en que la presencia de antibióticos sirve para potenciar el crecimiento de *H. parasuis* en detrimento de otros microorganismos.

A partir del aislamiento de la bacteria, posteriormente se realizan una serie de pruebas bioquímicas que permiten identificar la especie y otras técnicas que permiten identificar serovar (test de ágar-gel precipitación) (Morozumi y Nicolet, 1986; Kielstein y Rapp-Gabrielson, 1992) o patrones proteicos (SDS-PAGE o "Fingerprinting" por endonucleasas de restricción) (Morozumi y Nicolet, 1986; Smart et al., 1988; Smart et al., 1993).



La inmunocitoquímica sobre tejidos fijados en formol e incluidos en parafina ha sido una técnica inmunológica standard de avidina-biotina sobre tejido, utilizada esporádicamente con el único objeto de caracterizar lesiones pulmonares debidas a *H. parasuis*. El antígeno bacteriano ha sido hallado asociado a lesiones neumónicas purulentas, citoplasma de neutrófilos, macrófagos intersticiales y algunos macrófagos alveolares (Narita et al. 1994).

### 2.7.3 Detección de anticuerpos

Actualmente existen distintas pruebas de serología para *H. parasuis*, con la limitación de que no se dispone de técnicas que reconozcan específicamente los distintos serovares, con la dificultad añadida de que existen ciertas reacciones cruzadas entre algunos serovares (White et al., 1995).

Las técnicas desarrolladas hasta ahora han sido la fijación de complemento, ELISA indirecto, con modificaciones, y test de inmunofluorescencia sobre portaobjetos.

La fijación de complemento es una técnica que permite detectar anticuerpos frente a *H. parasuis* sobre los 6-8 días PI en caso de infecciones experimentales, pero se trata de una técnica de lectura subjetiva y de sensibilidad y especificidad intermedia (Nielsen y Danielson, 1975).

El ELISA indirecto es la técnica serológica más utilizada para la detección de anticuerpos anti-*H. parasuis*. En una primera descripción de esta técnica (Smidt et al., 1984) se utiliza un antígeno bacteriano no testado en cuanto a su patogenicidad o serotipo, obteniendo unos resultados relativamente poco específicos y sensibles, dado que se daba reacción cruzada con *A. pleuropneumoniae*. Recientemente se ha descrito otro ELISA indirecto en el que se utiliza como antígeno un serovar reconocidamente patógeno de *H. parasuis*, obteniendo niveles aceptables de especificidad y sensibilidad, aunque no se descarta la reactividad cruzada entre serovares y por tanto puede no ser útil en la discriminación entre serovares patógenos y no patógenos (Méndez-Trigo, 1994). No obstante, ésta no es una prueba de disponibilidad muy frecuente en laboratorios de diagnóstico.

Finalmente, ha sido descrito un test de inmunofluorescencia sobre portabojetos. Esta prueba utiliza como antígeno un serovar 5 de *H. parasuis*, aunque hasta el momento se trata de una prueba usada para sueros procedentes de animales infectados experimentalmente con el mismo serovar y que ha demostrado una alta especificidad pero una sensibilidad media (Solano y Pijoan, 1994).

## 2.8 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

A través de la sintomatología clínica y de las lesiones halladas macroscópicamente, la infección por *H. parasuis* puede ser confundida con otros tipos de procesos bacterianos. Básicamente con aquellos que producen enfermedad septicémica, y más concretamente con aquellos capaces de desarrollar un cuadro lesional de poliserositis fibrinosa (McDaniels y Cairns, 1991; Nicolet, 1992).

De las enfermedades que se han descrito que pueden cursar con poliserositis fibrinosa o fibrino-purulenta cabe destacar la infección por *Streptococcus suis* tipo II (Sanford y Higgins, 1992), *Mycoplasma hyorhina*, *Actinomyces pyogenes* y *Escherichia Coli* (Barker, 1991). No obstante, se considera a *S. suis* tipo II como un microorganismo que básicamente produce lesión nerviosa; la inoculación intravenosa o intraperitoneal se ha relacionado con el proceso de poliserositis, pero esta es una vía de infección considerada no natural. *A. pyogenes* y *E. coli* son microorganismos que causan básicamente peritonitis, secundaria en la mayoría de casos a procesos inflamatorios relacionados con la castración. Se considera a la infección por *M. hyorhina* como la más fácilmente confundible con la enfermedad de Glässer, y más por el hecho de que éste es también un microorganismo asociado a neumonía en cerdos; no obstante, este tipo de micoplasmosis supone un cuadro generalmente más moderado y crónico, y no se suele acompañar de cuadros nerviosos centrales. Siempre es necesario la confirmación microbiológica para el diagnóstico final (Nicolet, 1992).

En caso de que la sintomatología nerviosa sea la que predomine, será necesario establecer un diagnóstico diferencial con la meningitis producida por *S. suis* tipo II, enfermedad de los edemas (enterotoxemia causada por *E. coli*), intoxicación por sal y cuadros nerviosos

producidos por agentes víricos tales como enfermedad de Aujeszky y enfermedad de Teschen-Talfan (McDaniels y Cairns, 1991; Nicolet, 1992).

El tipo de neumonía asociada a *H. parasuis*, bronconeumonía catarral-purulenta de distribución craneoventral, incluiría como diagnóstico diferencial a la mayoría de agentes bacterianos y micoplasmas que producen lesiones neumónicas en los cerdos. No obstante, cabe tener en cuenta la presencia concomitante de otras lesiones que orienten el diagnóstico de infección por *H. parasuis* (Dungworth, 1991).

La miositis fibrino-purulenta de músculos maseteros no admite confusión, dado que en el cerdo no se ha diagnosticado este cuadro más que una vez y asociado a *H. parasuis* (Hoefling, 1991).

## 2.9 INMUNIDAD Y PROTECCIÓN

Se admite que la protección frente a *H. parasuis* viene determinada por la existencia de inmunidad humoral en el hospedador (Nielsen y Danielson, 1975). La enfermedad de Glässer ha sido asociada a bajos niveles de anticuerpos circulantes. La tendencia a mantener poblaciones porcinas aisladas con el objeto de obtener animales colonizados por el menor número de patógenos posibles (por producción en varios sitios, destete temprano medicado,...) reduce la oportunidad de adquirir inmunidad contra *H. parasuis* por falta de exposición (Rapp-Gabrielson et al., 1994).

A través de varios estudios relacionados con el establecimiento de inmunidad y reacción cruzada entre los distintos serovares de *H. parasuis* se ha podido concluir que las cepas de esta bacteria difieren claramente en virulencia e inmunogenicidad para el cerdo, y que estas diferencias parecen asociadas al serovar capsular (Kielstein y Rabßach, 1991; Miniats et al., 1991a,b; Nielsen, 1993; Kocur et al., 1994; Rapp-Gabrielson et al., 1994a,b; White et al., 1995).

En los primeros estudios de inmunidad cruzada se comprobó que habitualmente se produce una inmunidad adecuada frente a desafíos homólogos, pero que la protección cruzada es un fenómeno que ocurría con menor frecuencia e intensidad para la mayoría de serovares (Kielstein y Rabßach, 1991).

En otros estudios se mostró que una bacterina preparada con un aislamiento de *H. parasuis* del cual se había demostrado previamente su patogenicidad, proporcionaba protección contra ese mismo serovar. Sin embargo, en experimentos de vacunación con 2 cepas de alta virulencia y otra de baja virulencia, se observó que las dos primeras protegían tanto homóloga como heterológamente contra las otras dos cepas (de alta y baja virulencia), mientras que los animales vacunados con la cepa de baja virulencia quedaban protegidos homológamente y sólo contra una de las cepas de alta virulencia. A pesar de que en estos estudios no se tuvo en cuenta el serovar concreto de cada cepa, si pudo concluirse que las cepas utilizadas diferían en su antigenicidad, y que virulencia e inmunoprotección eran parámetros relacionados positivamente. Asimismo, los anticuerpos detectados en suero eran contra OMPs de la bacteria, pero no contra lipopolisacárido o polisacáridos capsulares (Miniats et al., 1991a,b).

Experimentos consistentes en la inoculación de cerdos con serovares del 1 al 7 y la observación de los títulos generados para cada uno de esos serovares por la prueba de fijación de complemento (FCT) dieron los resultados mostrados en la Tabla 5 (Nielsen, 1993).

**Tabla 5.** Resultados serológicos de fijación de complemento para distintos serovares realizados a partir de sueros de animales inoculados con un serovar concreto.

SEROVAR INOCULADO	FCT POSITIVO PARA LOS SEROVARES
1	1 y 3
2	2, 4, 5 y 7
3	1 y 3
4	2, 4, 5 y 7
5	2, 4, 5, 6 y 7
6	2, 4, 5, 6 y 7
7	2, 4, 5, 6 y 7

Estos experimentos sugieren la posibilidad de protección cruzada entre algunos serovares, como posteriormente se comprobó mediante un desafío con una cepa de serovar 5. La protección se extendía también a animales que habían sido vacunados inicialmente con serovar 3. A partir de estos datos se sugirió que los anticuerpos detectados por la prueba de FCT permitían diferenciar 2 grupos de serovares antigénicamente relacionados: el formado por los serovares 1 y 3, y el formado por el 2, 4, 5, 6 y 7, pero que estos anticuerpos no son los que reconocen epítomos relacionados con virulencia (Nielsen, 1993).

Los estudios vacunales y de inmunidad más recientes han concluido, confirmando trabajos anteriores, que las bacterinas de *H. parasuis* pueden conseguir una buena protección serovar-específica y, en algunos casos, cierto nivel de protección frente a serovares heterólogos. La utilización de una bacterina de *H. parasuis* elaborada con los serovares 4 y 5 protegía de la aparición de lesiones de la enfermedad de Glässer en animales desafiados con los serovares homólogos, en comparación con los grupos no vacunados. Asimismo, proporcionaba cierto grado de protección a los animales inoculados con serovares 13 o 14. No obstante, la misma bacterina no protegía contra la infección post-vacunación con los serotipos 2 y 12. Es más, bacterinas elaboradas con estos dos últimos serovares fueron usadas con un posterior desafío homólogo, y se demostró que los dos serovares son virulentos y que en la mayoría de los casos no son protectores ni siquiera contra el mismo serovar (Kocur et al., 1994; Rapp-Gabrielson et al., 1994a,b; White et al., 1995). A partir de estos resultados quedó claro que los epítomos inmunógenos de *H. parasuis* no se encuentran del todo definidos, aunque parezcan incluir determinantes que suponen especificidad de serovar y de reacción cruzada con algunos serovares. Además, la virulencia de la cepa no nos asegura que su uso como bacterina sea totalmente eficaz. Quizás el hecho de que algunas cepas virulentas sean poco inmunógenas pueda explicar parcialmente porque las bacterinas autógenas no siempre son eficaces (White et al., 1995).

## **2.10 TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN**

La instauración de medidas terapéuticas lo más tempranamente posible una vez detectada la infección es fundamental para el control de la misma. Se recomienda un tratamiento parenteral,

el cual debería ser repetido en intervalos de 24 horas. Además, se considera necesario tratar a todos los animales del grupo en el cual se hayan detectado algunos afectados clínicamente y, en muchos casos, se requieren elevadas dosis con el objeto de permitir la penetración por difusión de antibióticos a líquido cefalorraquídeo y cavidad articular (Nicolet, 1992).

*H. parasuis* es habitualmente sensible a penicilina, ampicilina, cloramfenicol, cotrimoxazol (trimetoprim + sulfonamida), bacitracina, estreptomina y tetraciclinas, considerándose a éstas últimas como los antibióticos de elección. Aminoglicósidos y sulfamidas son menos efectivas, al menos *in vitro*. No obstante, se considera que la mejor actuación supone la realización de un antibiograma para cada caso (McDaniels y Cairns, 1991; Nicolet, 1992).

A nivel preventivo es necesario tomar una serie de medidas que, básicamente, incluyen manejo y vacunación.

En cuanto al manejo se recomienda no mezclar animales procedentes de distintos orígenes, especialmente si uno de los grupos es libre de patógenos específicos (SPF), dado que el estado inmunitario y de colonización por *H. parasuis* puede ser muy variado. También se recomienda una reducción de las situaciones de estrés (McDaniels y Cairns, 1991; Nicolet, 1992). En algunos casos se recomienda el uso de tetraciclinas en el pienso y/o agua para animales de transición en general y recién destetados especialmente, con una duración de tratamiento de 3 o 4 semanas (Hill et al., 1993).

La vacunación se basa en el uso de bacterinas autógenas derivadas de un cultivo de *H. parasuis* procedente de la granja, y se recomienda su uso a las 3 y 1 semanas antes de realizar un cambio de local de los animales. En algunos casos se logró una protección total, de manera que no hubo infección (Wiseman et al., 1989), pero también es sabido que para ciertos serovares, especialmente 2 y 12, la protección homóloga es muy discutible (White et al., 1995).

Experimentos recientes han mostrado que la vacunación de cerdas en el último tercio de gestación es otra alternativa. Lechones vacunados o no, procedentes de cerdas vacunadas, no desarrollaron enfermedad clínica aunque cierto porcentaje de animales mostraron niveles

variables de neumonía, mientras que lechones vacunados o no, procedentes de cerdas no vacunadas, desarrollaron enfermedad de Glässer (Solano et al., 1996).

## 2.11 BIBLIOGRAFÍA

BARKER, I.K.

The peritoneum and retroperitoneum.

En: Pathology of domestic animals, 4th Edition, Jubb, Kennedy & Palmer Ed., Vol. 2: 433-441, 1991.

BIBERSTEIN, E.L.; GUNNARSON, A.; HURVELL, B.

Cultural and biochemical criteria for the identification of *Haemophilus* spp. from swine.

Am. J. Vet. Res., 38: 7-11, 1977.

CHITKO-McKOWN, C.G.; CHAPES, S.K.; BROWN, R.E.; PHILLIPS, R.D.

Porcine alveolar and pulmonary intravascular macrophages: comparison of immune functions.

J. Leuko. Biol., 50: 364-372, 1991.

CHOI, K.H.; MAHESWARAN, S.K.; FELICE, L.J.

Characterization of outer membrane protein-enriched extracts from *Pasteurella multocida* isolated from turkeys.

Am. J. Vet. Res., 50: 676-683, 1989.

CHOI-KIM, K.; MAHESWARAN, S.K.; FELICE, L.J.; MOLITOR, T.W.

Relationship between the iron regulated outer membrane proteins and the outer membrane proteins of in vivo grown *Pasteurella multocida*.

Vet. Microbiol., 28: 75-92, 1991.

COLLINS, J.E.; ROSSOW, K.D.

Pathogenesis of PRRS.

Proc. Allen D. Leman Swine Conf., 47-48, 1993.

DUNGWORTH, D.L.

The respiratory system.

En: Pathology of domestic animals, 4th Edition, Jubb, Kennedy & Palmer Ed., Vol. 2: 639-640, 1991.

EAVES, L.E.; BLACKALL, P.J.; FEGAN, M.

Characterisation and antimicrobial sensitivity of haemophili isolated from pigs.

Aus. Vet. J., 66 (1): 1-4, 1989.

FARLEY, M.M.; STEPHENS, D.S.; KAPLAN, S.L.; MASON, E.O.

Pilus- and non-pilus-mediated interactions of *Haemophilus influenzae* type b with human erythrocytes and human nasopharyngeal mucosa.

J. Infect. Dis., 161: 274-280, 1990.

GLÄSSER, K.

Die fibrinöse Serosen- und Gelenkentzündung der Ferkel.

En: Die Krankheiten des Schweines. M.& H. Schaper Ed.; 122-125, 1910.

HILL, H.T.; CONNOR, J.F.; GILLESPIE, T.; LOULA, T.J.; SAWATSKY, J.; THACKER, B.

Roundtable discussion: *Haemophilus parasuis*, part 3.

Agri. Prac., 14 (5): 5-9, 1993.

HJÄRRE, A.; WRAMBY, G.

Über die fibrinöse Serosa-Gelenkentzündung (Glässer) beim Schwein.  
Z. Infektionskr. Parasitenkd. Krankheit Hyg. Haustiere, 60: 37-64, 1943.

HOEFLING, D.C.

Acute myositis associated with *Haemophilus parasuis* in primary SPF sows.  
J. Vet. Diagn. Invest., 3: 354-355, 1991.

HOEFLING, D.C.

The various forms of *Haemophilus parasuis*.  
Swine Health Prod., 2 (1): 19, 1994.

KESSINGER, M.; ESKEW, M.L.; SCHEUCHEZUBER, W.; ZARKOWER, A.

Porcine effector mechanisms: antibody dependent-cell mediated cytotoxicity or pseudorabies-infected target cell.  
Vet. Immunol. Immunopathol., 14: 223, 1987.

KIELSTEIN, P.; RAßBACH, A.

Serologische Typisierung und Nachweis immunogener Kreuzreaktionen von *Haemophilus parasuis* (Glässersche Krankheit).

Mh. Vet. Med., 46: 586-589, 1991.

KIELSTEIN, P.; RAPP-GABRIELSON, V.J.

Designation of 15 serovars of *Haemophilus parasuis* on the basis of immunodiffusion using heat-stable antigen extracts.

J. Clin. Microbiol., 30 (4): 862-865, 1992.

KIELSTEIN, P.; ROSNER, H.; RAßBACH, A.

Die Glässersche Krankheit als Enzootie in Schweinegroßbeständen und die Bedeutung bestimmter biologischer Eigenschaften von *Haemophilus parasuis* für den Krankheitsverlauf.

Mh. Vet. Med., 47: 539-544, 1992.

KIELSTEIN, P.; RAßBACH, A.; PÖHLE, D.; JOHANNSEN, U.; WIEGAND, M.; SCHÄFER, M.

Zur Pathogenese der *Haemophilus parasuis* Infektion des Schweines (Glässersche Krankheit).

Mh. Vet. Med., 49: 71-75, 1994.

KILIAN, M.

A rapid method for the differentiation of *Haemophilus* strains

Acta. Path. Microbiol. Scand., sec. B, 82: 835-842, 1974.

KILIAN, M.; NICOLET, J.; BIBERSTEIN, E.L.

Biochemical and serological characterization of *Haemophilus pleuropneumoniae* (Matthews and Pattison 1961) Shope 1964 and proposal of a neotype strain.

Int. J. Syst. Bacteriol., 28: 20-26, 1978.

KIRK CLARK, L.; HILL, M.A.; KNIFFEN, T.S.; VAN ALSTINE, W.; STEVENSON, G.; MEYER, K.B.; WU, C.C.; SCHEIDT, A.B.; KNOX, K.; ALBREGTS, S.

An evaluation of the components of medicated early weaning.

Swine Health Prod., 2 (3): 5-11, 1994.

KOBISH, M.; DESMETTRE, P.; MAGUEUR, S.; MORVAN, P.; PAILLE, G.

Hemophilose du porc: pouvoir pathogène expérimental de deux souches d'*Haemophilus parasuis*.

Rec. Méd. Vét., 156 (3): 219-224, 1980.

KOCUR, G.J.; CLARK, J.T.; MUIR, S.K.; RAPP-GABRIELSON, V.J.

Protection and cross-protection of pigs vaccinated with different serovars of *Haemophilus parasuis*.

Proc. 75th Ann. Meet. CRWAD, 44, 1994.



- KRÜGER, M.; PHU, C.H.; ZUCKER, B.; HORSCH, F.  
 Untersuchungen zur Besiedlung der Nasenschleimhaut von Ferkeln und Läufern mit den atemwegsrelevanten Bakterienspezies *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida* und *Haemophilus parasuis* in Beständen mit großer Tierkonzentration.  
 Mh. Vet. Med., 48: 418-424, 1993.
- LEWIS, A.; SHOPE, R.E.  
 Swine Influenza II. A hemophilic bacillus from the respiratory tract of infected swine.  
 J. Exp. Med. 54: 361-371, 1931.
- LITTLE, T.W.A.  
*Haemophilus* infection in pigs.  
 Vet. Rec., 87: 399-402, 1970.
- MADSEN, P.  
 Atypical outbreaks of Glässer's disease in Danish pig herds.  
 Proc. 8th IPVS-Congress, Belgica, 1984.
- McDANIELS, T.; CAIRNS, R.  
*Haemophilus parasuis* and its role in Swine disease.  
 Agri. Pract., 11 (7): 24-26, 1991.
- MENARD, J.; MOORE, C.  
 Epidemiology and management of Glässer's disease in SPF pigs.  
 Proc. 21st Ann. Meet. AASP, 187-200, 1990.
- MENDEZ-TRIGO, A.  
 Serology and identification of *Haemophilus parasuis*.  
 Proc. Allen D. Leman Conference, vol. 21: 6-7, 1994.
- MINIATS, O.P.; SMART, N.L.; EWERT, E.  
 Vaccination of gnotobiotic primary specific pathogen-free pigs against *Haemophilus parasuis*.  
 Can. J. Vet. Res., 55: 33-36, 1991a.
- MINIATS, O.P.; SMART, N.L.; ROSENDAL, S.  
 Cross protection among *Haemophilus parasuis* strains in immunized gnotobiotic pigs.  
 Can. J. Vet. Res., 55: 37-41, 1991b.
- MOLLER, K.; KILIAN, M.  
 V factor-dependent members of the family *Pasteurellaceae* in the porcine upper respiratory tract.  
 J. Clin. Microbiol., 28 (12): 2711-2716, 1990.
- MOLLER, K.; ANDERSEN, L.V.; CHRISTENSEN, G.; KILIAN, M.  
 Optimization of the detection of NAD dependent *Pasteurellaceae* from the respiratory tract of slaughterhouse pigs.  
 Vet. Microbiol., 36: 261-271, 1993.
- MOROZUMI, T.; NICOLET, J.  
 Morphological variations of *Haemophilus parasuis* strains.  
 J. Clin. Microbiol., 23 (1): 138-142, 1986a.
- MOROZUMI, T.; NICOLET, J.  
 Some antigenic properties of *Haemophilus parasuis* and a proposal for serological classification.  
 J. Clin. Microbiol., 23 (6): 1022-1025, 1986b.
- MORTON, D.J.; WILLIAMS, P.  
 Utilization of transferrin-bound iron by *Haemophilus* species of human and porcine origins.  
 FEMS Microbiol. Let., 65: 123-128, 1989.

- MOUSING, J.; LYBYE, H.; BARFOD, K.; MEYLING, A.; RONSHOLT, L.; WILLEBERG, P.  
Chronic pleuritis in pigs for slaughter: an epidemiological study of infectious and rearing system-related risk factors.  
*Prev. Vet. Med.*, 9: 107-119, 1990.
- MOXON, E.R.; WILSON, R.  
The role of *Haemophilus influenzae* in the pathogenesis of pneumonia.  
*Rev. Infect. Dis.*, 13 (Suppl. 6): S518-527, 1991.
- MÜNCH, S.; GRUND, S.; KRÜGER, M.  
Fimbriae and membranes on *Haemophilus parasuis*.  
*J. Vet. Med. B*, 39: 59-64, 1992.
- NARITA, M.; KAWASHIMA, K.; MATSUURA, S.; UCHIMURA, A.; MIURA, Y.  
Pneumonia in pigs infected with Pseudorabies virus and *Haemophilus parasuis* serovar 4.  
*J. Comp. Pathol.*, 110 (4): 329-339, 1994.
- NASCIMIENTO, J.; FAGUNDES, E.  
Estudo da "Doença de Glasser" experimental em leitões oriundos de rebanho formado por desmama precoce medicada (DPM).  
*Arq. Brasil. Med. Vet. Zoot.*, 44 (2): 158-160, 1991.
- NEIL, D.H.; MCKAY, K.A.; L'ECUYER, C.; CORNER, A.H.  
Glasser's disease of swine produced by the intratracheal inoculation of *Haemophilus suis*.  
*Can. J. Comp. Med.*, 33: 188-193, 1969.
- NICOLET, J.; PAROZ, P.; KRAWINKLER, M.  
Polyacrylamide gel electrophoresis of whole-cell proteins of porcine strains of *Haemophilus*.  
*Int. J. Syst. Bacteriol.*, 30 (1): 69-76, 1980.
- NICOLET, J.  
*Haemophilus parasuis*.  
En: *Diseases of Swine*, 7th Ed., Leman, Straw, Mengeling, D'Allaire y Taylor Ed., Iowa State University Press, 526-528, 1992.
- NIELSEN, R.; DANIELSON, V.  
An outbreak of Glässer's disease. Studies on etiology, serology and the effect of vaccination.  
*Nord. Vet. Med*, 27: 20-25, 1975.
- NIELSEN, R.  
Glasser's disease. Clinical and epidemiological field studies.  
Proc. 6th IPVS Congress, Dinamarca, 192, 1980.
- NIELSEN, R.  
Pathogenicity and immunity studies of *Haemophilus parasuis* serotypes.  
*Acta Vet. Scand.*, 34: 193-198, 1993.
- PALMER, N.  
Bones and joints.  
En: *Pathology of domestic animals*, 4th Edition, Jubb, Kennedy & Palmer Ed., Vol. 1: 101-108, 1991.
- PEET, R.L.; FRY, J.; LLOYD, J.; HENDERSON, J.; CURRAN, J.; MOIR, D.  
*Haemophilus parasuis* septicaemia in pigs.  
*Aus. Vet. J.*, 60 (6): 187, 1983.
- PLJOAN, C.; MORRISON, R.B.; HILLEY, H.D.  
Dilution technique for isolation of *Haemophilus* from swine lungs collected at slaughter.  
*J. Clin. Microbiol.*, 18 (1): 143-145, 1983.

- PIJOAN, C.  
Pathogenesis of *Haemophilus parasuis*.  
Proc. Allen D. Leman Conf., 54, 1995.
- PÖHLE, D.; JOHANNSEN, U.; KIELSTEIN, P.; RAßBACH, A.; WIEGAND, M.  
Investigations on pathology and pathogenesis of *Haemophilus parasuis* infection of swine.  
Proc. 12th. IPVS Congress, Holanda, 335, 1992.
- RAßBACH, A.  
Biochemische und serologische typisierung von *Haemophilus parasuis*.  
Mh. Vet. Med., 47: 637-641, 1992.
- RAPP, V.J.; ROSS, R.F.; YOUNG, T.F.  
Characterization of *Haemophilus* spp. isolated from healthy swine and evaluation of cross-reactivity of complement-fixing antibodies to *Haemophilus pleuropneumoniae* and *Haemophilus* taxon "minor group".  
J. Clin. Microbiol., 22 (6): 945-950, 1985.
- RAPP, V.J.; ROSS, R.F.; NICOLET, J.  
Characterization of the outer membrane proteins of *Haemophilus parasuis*.  
Proc. 9th IPVS Congress, Barcelona (España), 262, 1986
- RAPP-GABRIELSON, V.J.; GABRIELSON, D.A.  
Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars among isolates from swine.  
Am. J. Vet. Res., 53 (5): 659-664, 1992.
- RAPP-GABRIELSON, V.J.; GABRIELSON, D.A.; MUSSER, J.M.  
Phenotypic and genotypic diversity of *Haemophilus parasuis*.  
Proc. 12th IPVS Congress, Holanda, 334, 1992a.
- RAPP-GABRIELSON, V.J.; GABRIELSON, D.A.; SCHAMBER, G.J.  
Comparative virulence of *Haemophilus parasuis* serovars 1 to 7 in guinea pigs.  
Am. J. Vet. Res., 53 (6): 987-994, 1992b.
- RAPP-GABRIELSON, V.J.; KOCUR, G.J.; MUIR, S.K.; CLARK, J.T.  
*Haemophilus parasuis*: immunogenicity and cross-protection between different serovars.  
Proc. 25th Ann. Meet. AASP, 26-28, 1994a.
- RAPP-GABRIELSON, V.J.; KOCUR, G.J.; MUIR, S.K.; CLARK, J.T.  
Cross-protection following vaccination of swine with different serovars of *Haemophilus parasuis*.  
Proc. 13th IPVS Congress, Tailandia, 1994b.
- RILEY, M.G.I.; RUSSELL, E.G.; CALLINAN, R.B.  
*Haemophilus parasuis* infection in swine.  
J. Am. Vet. Med. Assoc., 171: 649-651, 1977.
- ROSENDAL, S.; BOYD, D.A.  
*Hemophilus*.  
En: Pathogenesis of bacterial infections in animals. 4th. Edition, Iowa State University Press, 132-136, 1985.
- SANFORD, S.E.; HIGGINS, R.  
Streptococcal diseases.  
En: Diseases of Swine, 7th Ed., Leman, Straw, Mengeling, D'Allaire y Taylor Ed., Iowa State University Press, 588-590, 1992.
- SMART, N.L.; MINIATSM, O.P.; MacINNES, J.I.  
Analysis of *Haemophilus parasuis* isolates from Southern Ontario swine by restriction endonuclease fingerprinting.  
Can. J. Vet. Res., 52: 319-324, 1988.

SMART, N.L.; MINIATS, O.P.; ROSENDAL, S.; FRIENDSHIP, R.M.

Glässer's disease and prevalence of subclinical infection with *Haemophilus parasuis* in swine in southern Ontario.

Can. Vet. J., 30: 339-343, 1989.

SMART, N.L.; HURNIK, D.; MacINNES, J.I.

An investigation of enzootic Glasser's disease in a specific-pathogen free grower-finisher facility using restriction endonuclease analysis.

Can. Vet. J., 34: 487-490, 1993.

SMIDT, E.M.; NIELSEN, R.; RIISING, H.J.

Enzyme immunoassay for *Haemophilus parasuis* antibodies in pigs.

Proc. 8th IPVS Congress, Belgique, 1984.

SOLANO, G.I.; PIJOAN, C.

Immunofluorescence for detecting susceptible animals to *Haemophilus parasuis*.

Proc. 75th Ann. Meet. CRWAD, P25, 1994.

SOLANO, G.I.; RAPP-GABRIELSON, V.; CARVALHO, L.F.; COLLINS, J.; WINKELMAN, N.; PIJOAN, C.

The role of maternal immunity in *Haemophilus parasuis* infection.

Proc. 27th Annual Meeting AASP, 433-436, 1996.

STEPHENS, D.S.; FARLEY, M.M.

Pathogenic events during infection of the human nasopharynx with *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae*.

Rev. Infect. Dis., 12: 22-33, 1991.

VAHLE, J.L.; ANDREWS, J.J.; HAYNES, J.S.

Experimental reproduction of *Haemophilus parasuis* infection in swine: clinical, bacteriologic and morphologic findings.

Proc. 37th Ann. Meet. AAVLD, 82, 1994.

VAHLE, J.L.; HAYNES, J.S.; ANDREWS, J.J.

Pathogenesis of *Haemophilus parasuis* infection: update of current research.

Proc. 26th Ann. Meet. AASP, 417-420, 1995.

VAN ALPHEN, L.; VAN DEN BERGHE, N.; VAN DEN BROEK, L.G.

Interaction of *Haemophilus influenzae* with human erythrocytes and oropharyngeal epithelial cells is mediated by a common fimbrial epitope.

Infect. Immun., 56 (7): 1800-1806, 1988.

VON ROSNER, H.; KIELSTEIN, P.; MÜLLER, W.; ROHRMANN, B.

Beziehungen zwischen Serotyp, Virulenz und SDS-PAGE-Proteinmustern von *Haemophilus parasuis*.

Deuts. Tierärztl. Wochenschr., 98 (9): 327-330, 1991.

WHITE, R.D.; KOCUR, G.J.; CLARK, J.T.; MUIR, S.K.; RAPP-GABRIELSON, V.J.

Efficacy of *Haemophilus parasuis* bacterins against challenge with different *H. parasuis* serovars.

Proc. 26th Ann. Meet. AASP, 109-110, 1995.

WISEMAN, B.; GLOCK, R.D.; WILKINS, L.

Management of seedstock that is negative for *Haemophilus parasuis*.

Proc. 20th Ann. Meet. AASP, 23-25, 1989.

ZHAO, G.; PIJOAN, C.; CHOI, K.; MAHESWARAN, S.K.; TRIGO, E.

Expression of iron-regulated outer membrane proteins by porcine strains of *Pasteurella multocida*.

Can. J. Vet. Res., 59: 46-50, 1995.

**CAPÍTULO 3:**

**INTERACCIÓN VÍRICO-BACTERIANA  
EN ENFERMEDADES RESPIRATORIAS  
PORCINAS**

### 3.1 INTRODUCCIÓN

En términos de enfermedades que afectan a la especie porcina se reconoce que las alteraciones patológicas más frecuentes se centran en el aparato respiratorio. El pulmón, específicamente, es un órgano diana para una gran cantidad de agentes etiológicos que tienen una vía de entrada aerógena. De hecho, la neumonía es considerada como la enfermedad más costosa que afecta a cerdos de transición y engorde (Plana-Duran et al., 1985; Straw, 1992; Pointon et al., 1992). Además, una cantidad muy importante de microorganismos se relacionan con la capacidad de producir y/o complicar enfermedad respiratoria en el cerdo (Tabla 1) (Halbur et al., 1992; Done et al., 1993; Higgins, 1993; Nicolet, 1993).

**Tabla 1.** Principales agentes infecciosos asociados a la producción y/o complicación de enfermedad respiratoria en cerdos

<b>VIRUS</b>	<b>BACTERIAS</b>
Influenza: H1N1 H1N1 variante H3N2	<i>Pasteurella multocida</i> tipo A tipo D
Aujeszky	<i>Bordetella bronchiseptica</i>
Síndrome Resp. y Repr. Porcino (PRRS)	<i>Streptococcus suis</i>
Peste Porcina Clásica (PPC)	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
Citomegalovirus Porcino	<i>Haemophilus parasuis</i>
Coronavirus Respiratorio Porcino (PRCV)	<i>Salmonella cholerae-suis</i>
Adenovirus	<i>Chlamydia psittaci</i>
Paramixovirus Porcino	
Encefalomiocarditis (EMCV)	
<b>MICOPLASMAS</b>	<b>PARÁSITOS / HONGOS</b>
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	<i>Ascaris suum</i>
<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	<i>Metastrongylus</i> spp.
	<i>Pneumocystis carinii</i>

De todos los microorganismos citados, con solo algunos de ellos se ha demostrado experimentalmente la existencia de sinergias y asociaciones en las cuales se logra la potenciación de enfermedad respiratoria o del cuadro generado por el microorganismo secundario. El objetivo básico de esta parte es establecer los mecanismos básicos por los cuales

se puede producir este tipo de interacción, centrada entre virus y bacterias en general, y específicamente en el cerdo.

### **3.2 MECANISMOS DE DEFENSA DEL APARATO RESPIRATORIO**

Dada su conexión con el medio externo, el tracto respiratorio es un aparato dotado de una amplia variedad de mecanismos de defensa contra agentes infecciosos, tóxicos y alérgicos (Green et al., 1977; Herscowitz, 1985; Christensen y Mousing, 1992). Tradicionalmente estos mecanismos han sido divididos en específicos y no específicos según la participación o no del sistema inmunológico, respectivamente (Green et al., 1977).

#### **3.2.1 Mecanismos de defensa inespecíficos**

Este tipo de mecanismos se encuentran representados por 3 funciones básicas: filtración aerodinámica, motilidad ciliar y secreción mucosa y, finalmente, fagocitosis.

##### **a) Filtración aerodinámica**

El tracto respiratorio es una estructura túbulo-alveolar con múltiples subdivisiones que permiten una rápida dispersión del aire entrante (Green et al., 1977). Mientras que la piel es un órgano perfectamente adaptado a prevenir la invasión de agentes potencialmente dañinos y con una superficie aproximada de  $1.8 \text{ m}^2$ , la superficie epitelial del tracto respiratorio actúa como una membrana de difusión selectiva que, en la especie humana, puede llegar a tener más de  $100 \text{ m}^2$  de superficie (Christensen y Mousing, 1992). La mayoría de partículas que entran a través de los orificios nasales impactan en las porciones anteriores del aparato respiratorio, de manera que a nivel alveolar difícilmente pueden llegar partículas con diámetros superiores a  $2 \text{ }\mu\text{m}$  (Pijoan, 1993).

##### **b) Motilidad ciliar y secreción mucosa**

El árbol respiratorio se encuentra tapizado de un epitelio pseudoestratificado cilíndrico ciliado que se extiende desde la naso-faringe hasta bronquiolos secundarios (Banks, 1992). Los cilios actúan como órgano de remoción de partículas extrañas en ausencia de patología, de manera que la probabilidad de colonización e infección se reduce considerablemente. Este efecto es

facilitado por la secreción de una sustancia mucosa que contiene componentes bactericidas y bacteriostáticos como lisozima, transferrina, fibronectina (facilita la fagocitosis y disminuye la adhesión bacteriana) y factores del sistema de complemento (Babiuk et al., 1988), y que fluye por efecto de los cilios en dirección a la faringe a una velocidad aproximada de 4-15 mm/minuto, siendo deglutida finalmente (Done, 1988).

### **c) Fagocitosis**

La presencia de células del sistema mononuclear fagocítico en el pulmón constituye la principal línea de defensa inespecífica, siendo a la vez una conexión directa con los mecanismos de defensa inmunológicos o específicos. En ausencia de alteraciones patológicas, de un lavado broncoalveolar se recuperan entre  $5 \times 10^8$  y  $10^9$  células, de las cuales el 95% o más corresponden, a través de técnicas con anticuerpos monoclonales, a macrófagos alveolares (PAM); el resto de células son linfocitos, polimorfonucleares neutrófilos (PMNN) y eritrocitos. Además, recientemente se han descrito distintas subpoblaciones de macrófagos alveolares con características morfológicas y funcionales distintas, incluyendo su capacidad fagocítica (Choi et al., 1995).

El proceso de fagocitosis comprende varias fases, incluyendo la adhesión o interacción de la célula con la partícula extraña, su incorporación en el interior celular (ingestión) formando un fagosoma, fusión de este fagosoma con lisosomas (obtención del fagolisosoma) y digestión de la partícula vía enzimática y especies reactivas de oxígeno (en caso de digestión de partículas vivas se utiliza la denominación de "muerte intracelular") (Ueda et al., 1981; Ito et al., 1981). La actividad de "muerte intracelular", básicamente referida a bacterias, se encuentra facilitada por efecto del surfactante (producto de secreción de neumocitos tipo II), el cual, por otra parte, tiene una actividad anti-bacteriana importante frente a gérmenes gram-positivos. Los PAM también manifiestan actividad antivírica, mediada específicamente por interferon (IFN), secreción de factores quimiotácticos para otras células fagocíticas y del sistema inmune, citoquinas (interleuquinas, factor de necrosis tumoral (TNF), factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF  $\beta$ ) y factores estimulantes de colonias) (Adams y Hamilton, 1992), y mediadores solubles como la fibronectina y factores del sistema de complemento (Babiuk et al., 1988).



Finalmente, una última línea de defensa inespecífica pulmonar es la constituida por macrófagos intravasculares pulmonares (PIM), también componentes del sistema mononuclear fagocítico, los cuales se encuentran adheridos a la superficie luminal de los capilares pulmonares. Estos macrófagos se han descrito solo en algunas especies de mamíferos domésticos y la especie humana, y se considera que tienen una gran importancia en la especie porcina (Chitko-McKown y Blecha, 1992). Concretamente se les ha relacionado con efectos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), actividad bactericida (básicamente de gérmenes gram negativos), fagocitosis y producción de una amplia variedad de citoquinas (Bertram, 1986; Chitko-McKown et al., 1991, 1992).

### **3.2.2 Mecanismos de defensa específicos o inmunológicos**

Aunque el pulmón no es un órgano linfoide, este contiene un elevado número de linfocitos que pueden encontrarse en distintos compartimientos (Pabst y Binns, 1994):

- \* compartimiento intravascular pulmonar
- \* intersticio pulmonar
- \* tejido linfoide asociado a bronquios (BALT)
- \* compartimiento intraepitelial y lámina propia del bronquio
- \* espacio broncoalveolar

La respuesta inmunológica se manifiesta como secreción de inmunoglobulinas (inmunidad humoral) y como respuesta inmune mediada por células (inmunidad celular).

#### **a) Inmunidad humoral**

La inmunoglobulina predominante en el aparato respiratorio es de tipo A (IgA), aunque se supone que, en muy bajos niveles, también se encuentra IgM, que es de mayor importancia en animales recién nacidos y en respuesta inmune temprana. En las porciones más inferiores del tracto respiratorio, cerca del alveolo, las IgG son las predominantes y tienen un origen sérico. En caso de infestaciones parasitarias y especialmente por *Metastrongylus* spp., los anticuerpos generados son de tipo IgE (Green et al., 1977; Christensen y Mousing, 1992).

La presencia de estas inmunoglobulinas es fundamental como agentes neutralizantes de agentes infecciosos y como facilitadores de la fagocitosis a través de la opsonización de estos agentes (Babiuk et al., 1988).

#### **b) Inmunidad celular**

Este tipo de defensa se encuentra representado por linfocitos T, células asesinas naturales (NK) y macrófagos activados, y se asume que es de vital importancia en el caso de infecciones respiratorias víricas (Christensen y Mousing, 1992).

### **3.3 CONCEPTOS GENERALES DE PATOGENIA DE LA INTERACCIÓN VÍRICO-BACTERIANA**

Existe evidencia clínica, epidemiológica y experimental indicativa de que las infecciones víricas respiratorias predisponen a la aparición de neumonías bacterianas (Warshauer et al., 1977); la presencia de lesión pulmonar de origen vírico puede promover la invasión secundaria de bacterias y, a la vez, interferir con los mecanismos normales de remoción bacteriana (Slauson, 1982; Babiuk et al., 1988). Este efecto ha sido especialmente estudiado en el caso de los ratones y con los virus de la Influenza y Parainfluenza 1 (virus de Sendai) (Warshauer et al., 1977; Jakab y Warr, 1981; Jakab, 1982).

Para muchos virus de tropismo respiratorio, y en las fases agudas de infección, las células epiteliales del tracto respiratorio aparecen como una de las localizaciones principales de replicación. En estas áreas se establece un proceso de degeneración del epitelio ciliar con posterior descamación, dejando solamente una capa basal de células de reemplazo. El grado de lesión histológica máximo suele aparecer a los 7 días PI vírica, donde las vías respiratorias se encuentran parcial o totalmente ocluidas por la presencia de células epiteliales degeneradas y células inflamatorias mononucleares procedentes de áreas peribronquiales intensamente infiltradas. En el parénquima pulmonar se observa hiperemia y aumento del grosor de los tabiques interalveolares, con infiltración intersticial de leucocitos y trombosis capilar (Jakab, 1982). La duración y severidad del proceso patológico depende directamente de la cantidad de virus que pueda llegar a las porciones inferiores del tracto respiratorio (Babiuk et al., 1988).

Habitualmente, el efecto dañino del virus empieza a declinar sobre los 9-10 días PI, y hacia las 2 semanas PI hay evidencia de reparación en áreas afectadas de la mucosa (Jakab, 1982).

También es de destacar la posibilidad de replicación vírica directamente en PAM, de manera que su funcionalidad puede verse seriamente comprometida (Plagemann y Moenning, 1992).

La respuesta inmediata del tejido pulmonar frente a la infección vírica incluye la producción de IFN, substancia de actividad antivírica y con capacidad de modular ciertas actividades de PAM *in vivo* e *in vitro*, y la producción de una respuesta antivírica específica. La activación de PAM supone un efecto beneficioso debido al incremento de producción de IFN y interleuquinas relacionadas con la activación de linfocitos, pero también implica un efecto dañino sobre el pulmón a través de componentes de complemento, interleuquina 1 (IL-1), factor agregante de plaquetas, factor tisular, derivados del ácido araquidónico y proteasas neutras (Jakab, 1982; Babiuk et al., 1988).

Realmente son muchas las modificaciones de las defensas del tracto respiratorio inducidas por la infección vírica. Estas modificaciones afectan tanto al componente específico como inespecífico de defensa, y son las responsables directas de que se pueda producir una superinfección bacteriana en el pulmón afectado. A continuación se detallan las alteraciones producidas en el sistema de defensa pulmonar que permiten la infección bacteriana secundaria (Jakab, 1982):

a) **Barrera muco-ciliar:** Se considera que la destrucción del epitelio muco-ciliar inhibe la remoción física de bacterias, además de que el exudado alveolar provocado por la infección vírica supone un medio de cultivo muy adecuado para la multiplicación bacteriana. Se ha calculado que el fluido de edema pulmonar permite una proliferación de bacterias suficientemente rápida como para colapsar y superar el sistema fagocítico establecido por PAM y PMNN. Ello supone a la vez la creación de condiciones de anaerobiosis a nivel alveolar, siendo la hipoxia uno de los fenómenos que disminuye la capacidad fagocítica de los PAM.

**b) PAM:** El efecto de la replicación vírica sobre los PAM puede ser muy variado, afectándose especialmente las actividades de quimiotaxis, unión a receptores de membrana (adherencia), fagocitosis mediada por receptores (la infección vírica produce una alteración de los procesos metabólicos de las células fagocíticas, de manera que la ingestión de partículas, proceso dependiente de energía, se encuentra disminuido), fusión del fagosoma y lisosoma, y actividad de muerte intracelular y degradación bacteriana, dado que se obtienen PAM con una cantidad anormalmente baja de enzimas lisosomales (efecto que produce la supresión de los mecanismos de digestión fagocítica) (Jakab, 1982; Babiuk et al., 1988).

**c) Neumocitos tipo II:** En algunos casos, la lesión vírica cursa con la destrucción de las células productoras del surfactante, los neumocitos tipo II. Esta disminución de surfactante implica una disminución de la capacidad fagocítica de los PAM, dado que este producto de secreción tiene, además de un efecto bactericida propio, un efecto de facilitación del proceso de fagocitosis por parte de macrófagos.

**d) Sistema inmunológico:** En la mayoría de los casos la máxima supresión causada por la replicación vírica ocurre al mismo tiempo en que el huésped es más susceptible a la infección bacteriana secundaria. Este efecto se relaciona directamente con la supresión de los mecanismos de defensa inmunológicos, y concretamente con la supresión de la actividad linfocitaria. Una razón para ello se relaciona con la inducción de células T supresoras y elevados niveles de interleuquina 2 (IL-2), además de un efecto del IFN que provoca la inhibición de proliferación linfocitaria *in vitro* y la reducción de la respuesta de los linfocitos a las interleuquinas (Babiuk et al. 1988). No obstante, la presencia de bacterias también reduce la efectividad de la respuesta inmune bajo mecanismos tales como:

- \* expresión de factores de virulencia de baja antigenicidad
- \* producción de proteasas de IgA
- \* formación de una pared bacteriana deficiente en aminoácidos de isómero L (de mucho mayor resistencia a la degradación)

Algunas bacterias, además, desarrollan mecanismos de resistencia a la muerte intracelular que incluyen presencia de glicolípidos sulfatados en la pared bacteriana, incremento de niveles de

AMP, presencia de ácidos poliglutámicos, producción de amoníaco y secreción de catalasas bacterianas.

Finalmente, y como factor asociado a la producción de sinergías entre virus y bacterias también se ha citado al estrés. Condiciones de hacinamiento de animales, de cambio súbito de ubicación, etc... pueden desencadenar una elevada secreción de hormona adenocorticotropa (ACTH), la cual, a su vez, provoca un incremento en la secreción de cortisol. Al cortisol se le asume un efecto supresor sobre los mecanismos de defensa específicos y inespecíficos del tracto respiratorio.

### **3.4 INFECCIÓN BACTERIANA ASOCIADA A ENFERMEDAD RESPIRATORIA VÍRICA EN EL CERDO**

En apartados anteriores se ha realizado una discusión general de los efectos que supone la asociación de virus y bacterias en el aparato respiratorio. En este apartado se pretende caracterizar los mecanismos asociados a esta interacción en la especie porcina en concreto y las implicaciones que ello supone.

En el cerdo se reconoce la existencia de varios virus que, por su tropismo respiratorio, permiten en algunos casos la superinfección bacteriana, con el agravamiento de la sintomatología respiratoria del animal o bien la facilitación de enfermedad por parte de la bacteria. Hasta el momento se han descrito algunas interacciones de este tipo en la especie porcina (Tabla 2).

Tabla 2. Principales asociaciones virus-bacteria para la especie porcina descritas en la literatura.

PRINCIPAL AUTOR	VIRUS	BACTERIA
Shope, 1931	Influenza	<i>Haemophilus suis</i>
Kasza, 1969	Adenovirus	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>
Pijoan, 1978	Peste Porcina Clásica	<i>Pasteurella multocida</i> tipo D
Fuentes, 1987	Aujeszky	<i>Pasteurella multocida</i> tipo D
Hall, 1987	Aujeszky	<i>Pasteurella multocida</i> tipo A (toxina)
Ramírez, 1990	Aujeszky	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
Iglesias, 1992	Aujeszky	<i>Streptococcus suis</i> tipo II
Galina, 1994	PRRS	<i>Streptococcus suis</i> tipo II
Narita, 1994	Aujeszky	<i>Haemophilus parasuis</i> (serovar 4)

El efecto de estos virus puede manifestarse a varios niveles (Galina, 1995):

#### a) Incremento de la adherencia bacteriana

La modificación del microambiente natural de la mucosa por efecto de la replicación vírica permite la adhesión y proliferación bacteriana, fenómeno conocido como “adherencia oportunista”. En el cerdo se ha relacionado este fenómeno con el virus de Aujeszky (Fuentes y Pijoan, 1987) y el PRRSv (Pol et al., 1991; Collins et al., 1992). No obstante, este efecto puede ser producido directamente por otras bacterias, tal como el caso de *Bordetella bronchiseptica*, la cual se ha demostrado como agente predisponente a la aparición de meningitis causada por *Streptococcus suis* tipo II (Vecht et al., 1989).

#### b) Secreción de enzimas y disminución de quimiotaxis

Este es un fenómeno relacionado especialmente con el virus de la Influenza porcina. Este virus produce una neuraminidasa capaz de destruir algunas glicoproteínas mucosas que normalmente previenen la adherencia bacteriana, y a la vez es un virus que provoca una baja respuesta a la quimiotaxis sobre células inflamatorias.

### **c) Reducción de remoción muco-ciliar**

Este es un mecanismo relacionado como parte de la patogenia de la interacción entre el virus de la PPC, e incluso de sus vacunas, y *Pasteurella multocida* tipo D (Pijoan y Ochoa, 1978; Iglesias y Pijoan, 1980), y consiste en una pérdida parcial o total de la funcionalidad de los cilios (ciliostasis parcial o total), de manera que el incremento de deposición mucosa actúa como caldo nutritivo para el posterior desarrollo bacteriano.

### **d) Efecto directo sobre las funciones de los PAM**

A este nivel cabe destacar los virus de la PPC, Aujeszky y PRRS, los cuales tienen la capacidad de replicarse en el interior de los PAM, entre otras células.

El virus de la PPC afecta tanto al proceso de fagocitosis como al de muerte intracelular en los PAM. No obstante, este último proceso es el más claramente afectado, de manera que se ha postulado la posibilidad de que la alteración se produzca a nivel de la fusión fagosoma-lisosoma (Pijoan et al., 1980).

•

El virus de la enfermedad de Aujeszky no afecta significativamente a la adherencia y ingestión de partículas o bacterias, pero sí tiene un efecto negativo sobre la fusión fagosoma-lisosoma y de la fagocitosis mediada por receptores Fc (Fuentes y Pijoan, 1986; Iglesias et al., 1988, 1989). Por ejemplo, los PAM son células muy eficientes en el control de *P. multocida*, y la infección con virus de Aujeszky explicaría perfectamente la disminución de fagocitosis de esta bacteria y por tanto la posibilidad de producir neumonía bacteriana (Fuentes y Pijoan, 1987). Un efecto muy similar ha sido sugerido para la interacción entre este virus y la bacteria *S. suis* tipo II (Iglesias et al., 1992) y *H. parasuis* serovar 4 (Narita et al., 1994).

El PRRSv se multiplica primariamente en PAM, logrando un efecto citopático dependiente de dosis y cepa vírica (Bautista et al., 1993). Los estudios del efecto de este virus sobre la funcionalidad de los PAM son escasos y, en condiciones *in vitro* parece que hay un efecto inicial de activación de estas células, dado que a las 14 y 22 horas PI se produce un incremento en la ingestión bacteriana de *S. suis* tipo II, en comparación con PAM no infectados, pero a la vez se observa una disminución de los niveles de muerte intracelular (Galina, 1994).

A pesar de que el efecto de la replicación vírica sobre PAM puede variar según el tipo de virus, recientemente se ha descrito la existencia de distintas subpoblaciones de PAM, con características morfológicas y funcionales distintas, de manera que no todas estas fracciones son igualmente sensibles a la replicación bacteriana, al menos con PRRSv. Concretamente se observa que son las poblaciones de PAM más fagocíticas aquellas que son también más sensibles a la replicación vírica por PRRSv (Choi et al., 1994, 1995).

#### **e) Estado inmunitario**

El estado inmunitario del cerdo es importante para el desarrollo de las infecciones bacterianas. Habitualmente, la mayoría de cerdos convencionales están expuestos en mayor o menor grado a agentes víricos tales como Adenovirus, virus de Aujeszky y PRRSv, de manera que la probabilidad de ocurrencia de infecciones secundarias es, teóricamente, mucho menor que la obtenida en estudios experimentales donde usualmente se utilizan cerdos vírgenes inmunitariamente (SPF o gnotobióticos) y dosis víricas y bacterianas muy elevadas (Galina, 1995). La posibilidad de sinergismo entre virus y bacterias está supeditada a:

- \* virulencia del virus; a mayor virulencia mayor grado de supresión de las defensas antibacterianas pulmonares por efecto del virus.
- \* inmunidad frente al virus; reduce el grado de infección vírica y, por tanto, complicaciones debidas a bacterias secundarias.
- \* la inmunidad anti-vírica no protege frente a virus heterólogos
- \* la eficacia de la inmunidad anti-bacteriana en la prevención de superinfecciones bacterianas depende directamente del tipo de microorganismo que actúe como patógeno.
- \* la inmunización activa y/o pasiva frente a bacterias no siempre previene la superinfección en pulmones infectados con virus.

Finalmente, cabría destacar que no en todos los casos de infección secundaria es un virus el iniciador. De hecho, se ha demostrado que la bacteria puede ser un factor predisponente de infección vírica, como el caso de la toxina de *P. multocida* tipo D, la cual intensifica la severidad de la infección del virus de Aujeszky (Hall et al., 1987). Además, en algunos modelos experimentales se observa que las infecciones bacterianas pueden predisponer a la infección por otras bacterias, tal como son el caso de sinergia entre *B. bronchiseptica* y *P.*



*multocida* tipo D (De Jong, 1992), el ya señalado entre *B. bronchiseptica* y *S. suis* tipo II (Vecht et al., 1989), y *M. hyopneumoniae* y *P. multocida* tipo A (Ciprián et al., 1988).

### 3.5 INFECCIONES SECUNDARIAS ASOCIADAS AL PRRS

La evidencia clínica ha sugerido que los brotes epizooticos causados por el PRRSv se continúan con una secuencia de eventos clínicos de duración variable entre 6 meses y 2 años que incluyen un claro aumento de la prevalencia de infecciones secundarias, no solo bacterianas sino también víricas (Pijoan et al., 1994).

Los procesos más directamente involucrados de forma clínica con la presencia de PRRS endémico han sido la meningitis estreptocócica, rinitis atrófica y poliserositis. En el laboratorio de diagnóstico de Iowa State University se confirmaron 385 casos de PRRS en el transcurso de 1994; en 185 (el 48%) de estos casos se produjo el aislamiento o identificación concurrente de otros virus y bacterias (Tabla 3) (Halbur et al., 1995).

**Tabla 3.** Aislamiento o identificación concomitante de virus y bacterias en 485 casos en los cuales fue diagnosticado infección por el PRRSv.

	AGENTE AISLADO	Nº CASOS/385	PORCENTAJE
Bacterias	<i>Pasteurella multocida</i>	71	18%
	<i>Streptococcus suis</i>	45	12%
	<i>Haemophilus parasuis</i>	40	10%
	<i>Escherichia coli</i> hemolítico	30	8%
	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	30	8%
	<i>Salmonella cholerae-suis</i>	28	7%
	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	18	5%
	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	13	3%
Virus	Influenza Porcina	18	5%
	Rotavirus	18	5%
	Gastroenteritis Transmisibile	7	2%
	Citomegalovirus	4	1%
	Virus de Aujeszky	2	0.5%
	Parvovirus	1	0.25%

No obstante, la evidencia clínica y de diagnóstico no debe de ser determinante, y más por el hecho de que la demostración experimental del PRRSv como iniciador de infecciones secundarias está resultando muy difícil (Pijoan et al., 1994).

La primera demostración experimental de interacción con el PRRSv fué realizada con *Streptococcus suis* tipo II (Galina 1994; Galina et al. 1994). La infección por vía intranasal con esta bacteria 5 días PI vírica resultó en la aparición de síntomas nerviosos característicos de meningitis. Trabajos posteriores *in vitro* demostraron que esta interacción podría relacionarse con una alteración relativamente tardía de los PAM, dado que en las primeras horas parece producirse un efecto de estímulo de la fagocitosis y muerte intracelular (Galina et al., 1994). No obstante, se han sugerido 2 hipótesis sobre la patogenia de este fenómeno:

\* el virus destruye a los PAM, los cuales serían substituidos por células inmaduras, y éstas no serían capaces de fagocitar y destruir *S. suis* permitiendo su posterior paso al torrente circulatorio (septicemia y llegada al encéfalo).

\* el virus produce inflamación y destrucción de la mucosa nasal, hecho que comporta una infiltración local de células inflamatorias y la posibilidad de que éstas fagociten a *S. suis* y pasen a torrente circulatorio hasta llegar al encéfalo.

Hasta el momento ha resultado infructuoso el intento de demostrar la posible sinergia entre el PRRSv y *Pasteurella multocida* (Carvalho et al., 1994), y los estudios de las posibles interacciones entre éste y otros virus han reflejado resultados contradictorios. Si parece real una interacción con el coronavirus respiratorio porcino (PRCV), aunque muy leve, pero la inoculación conjunta de PRRSv y virus de la Influenza porcina ha dado resultados muy variados (Van Reeth et al., 1994; Brun et al., 1994). Otro estudio experimental ha mostrado un efecto de mayor severidad de lesiones causadas por *Mycoplasma hyorhinis* en cerdos infectados previamente con el PRRSv (Kubo et al., 1995).

En conclusión, aunque se de por evidente que el PRRSv actua como iniciador de infecciones secundarias por un efecto de inmunosupresión básicamente a nivel pulmonar, los estudios experimentales con objeto de demostrar esta depresión inmunológica han mostrado, sorprendentemente, una respuesta mejor contra antígenos exógenos en animales infectados que

en los controles, atribuyéndose este hecho, al menos en parte, a una activación policlonal de los componentes del sistema inmunitario. Este efecto complica más aún la patogenia de la interacción del PRRSv con otros agentes y dificulta la explicación de la evidencia clínica (Molitor, 1994; Pijoan et al., 1994).

### 3.6 BIBLIOGRAFÍA

ADAMS, D.O.; HAMILTON, T.A.

Macrophages as destructive cells in host defense.

En: Basic principles and clinical correlates, 2nd Ed., Gallin, Goldstein & Synderman Eds., Raven Press, 636-662, 1992.

BABIUK, L.A.; LAWMAN, M.J.P.; BIELEFELDT OHMANN, H.

Viral-bacterial synergistic interaction in respiratory disease.

Adv. Vir. Res., 35: 219-249, 1988.

BANKS, W.J.

Respiratory system.

En: Applied veterinary histology, 3rd. Ed., Mosby Year Book, Inc., 390-404, 1992.

BAUTISTA, E.M.; GOYAL, S.M.; YOON, I.J.; JOO, H.S.; COLLINS, J.E.

Comparison of porcine alveolar macrophages and CL 2621 for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus and anti-PRRS antibody.

J. Vet. Diagn. Invest., 5 (2): 163-165, 1993.

BERTRAM, T.A.

Intravascular macrophages in lungs of pigs infected with *Haemophilus pleuropneumoniae*.

Vet. Pathol., 23: 681-691, 1986.

CARVALHO, L.F.; SEGALÉS, J.; SOLANO, G.; PIJOAN, C.

Effect of PRRSv with or without Aujeszky's virus on subsequent *P. multocida* challenge in pigs.

Proc. 75th Ann. Meet. CRWAD, P101, 1994.

CHITKO-McKOWN, C.G.; CHAPES, S.K.; BROWN, R.E.; PHILLIPS, R.M.; McKOWN, R.D.; BLECHA, F.

Porcine alveolar and pulmonary intravascular macrophages: comparison of immune functions.

J. Leuko. Biol., 50: 364- 372, 1991.

CHITKO-McKOWN, C.G.; BLECHA, F.

Pulmonary intravascular macrophages: a review of immune properties and functions.

Ann. Rech. Vet., 23: 201-214, 1992.

CHITKO-McKOWN, C.G.; REDDY, D.N.; CHAPES, S.K.; McKOWN, R.D.; BLECHA, F.

Immunological characterization of pulmonary intravascular macrophages.

Reg. Immunol., 4: 236-244, 1992.

CHOI, C.S.; GUSTAFSON, K.; CHINSAKCHAI, S.; HILL, H.; MOLITOR, T.

Heterogeneity of porcine alveolar macrophage subpopulations: immune functions and susceptibility to PEARs virus.

Proc. 13th IPVS Congress, Tailandia, 1994.

CHOI, C.S.; GUSTAFSON, K.; CHINSAKCHAI, S.; HILL, H.; SEGALÉS, J.; PIJOAN, C.; KIM, Y.B.; MOLITOR, T.

Heterogeneity of porcine alveolar macrophages: functional properties and susceptibility to virus infection.  
Vet. Immunol. Immunopathol., *acceptado*, 1996.

CHRISTENSEN, G.; MOUSING, J.

Respiratory system.

En: Diseases of Swine, 7th Ed., Leman, Straw, Mengeling, D'Allaire & Taylor Eds., Iowa State University Press, 138-162, 1992.

CIPRIAN, A.; PIJOAN, C.; CRUZ, T.; CAMACHO, J.; TORTORA, J.; COLMENARES, G.; LOPEZ-REVILLA, R.; GARZA, M.

*Mycoplasma hyopneumoniae* increases the susceptibility of pigs to experimental *Pasteurella multocida* pneumonia.  
Can. J. Vet. Res., 53: 434-438, 1988.

COLLINS, J.E.; BENFIELD, D.A.; CHRISTIANSON, W.T.; HARRIS, L.; CHRISTOPHER-HENNINGS, J.; SHAW, D.P.; GOYAL, S.M.; McCULLOUGH, S.; MORRISON, R.B.; JOO, H.S.; GORCYCA, D.; CHLADEK, D.

Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR 2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs.

J. Vet. Diagn. Invest., 4 (2): 117-126, 1992.

DE JONG, M.F.

Progressive atrophic rhinitis.

En: Diseases of Swine, 7th Ed., Leman, Straw, Mengeling, D'Allaire & Taylor Eds., Iowa State University Press, 414-435, 1992.

DONE, S.H.

Some aspects of respiratory defence with special reference to immunity.

Proc. 10th IPVS Congress, Brasil, 31-60, 1988.

DONE, S.H.; SPENCER, Y.I.; HIGGINS, R.J.; BROWN, I.H.; HANNAM, D.A.

Respiratory infections in pigs 1986-1993.

Pig Vet. J., 31: 72-81, 1993.

FUENTES, M.; PIJOAN, C.

Phagocytosis and intracellular killing of *Pasteurella multocida* by porcine alveolar macrophages after infection with Pseudorabies virus.

Vet. Immunol. Immunopathol., 13: 165-172, 1986.

FUENTES, M.C.; PIJOAN, C.

Pneumonia in pigs induced by intranasal challenge exposure with Pseudorabies virus and *Pasteurella multocida*.

Am. J. Vet. Res., 48 (10): 1446-1448, 1987.

GALINA, L.; MOLITOR, T.; PIJOAN, C.

Effect of PRRS virus on the clearance of *Streptococcus suis* serotype 2 by pig alveolar macrophages.

Proc. 13th IPVS Congress, Tailandia, 142, 1994.

GALINA, L.; PIJOAN, C.; SITJAR, M.; CHRISTIANSON, W.T.; ROSSOW, K.; COLLINS, J.E.

Interaction between *Streptococcus suis* serotype 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in specific pathogen-free piglets.

Vet. Rec., 134: 60-64, 1994.

GALINA, L.

Phagocytosis and intracellular survival of *Streptococcus suis* in normal and PRRSv-infected swine alveolar macrophages.

PhD Thesis, University of Minnesota, 1994.

GALINA, L.

Possible mechanisms of viral-bacterial interaction in swine.  
Swine Health Prod., 3 (1): 9-14, 1995.

GREEN, G.M.; JAKAB, G.J.; LOW, R.B.; DAVIS, G.S.

Defense mechanisms of the respiratory membrane.  
Am. Rev. Resp. Dis., 115: 479-514, 1977.

HALBUR, P.G.; PAUL, P.S.; JANKE, B.H.

Viral contributors to the porcine respiratory disease complex.  
Proc. 24th Ann. Meet. AASP, 343-350, 1993.

HALBUR, P.G.; ANDREWS, J.J.; PAUL, P.S.; RATHJE, J.

Strain variation of PRRS virus: field and research experiences.  
Proc. 26th Ann. Meet. AASP, 391-394, 1995.

HALL, M.R.; WILLIAMS, P.P.; RIMLER, R.B.

A toxin from *Pasteurella multocida* serogrup D enhances swine herpesvirus 1 replication/lethality *in vitro* and *in vivo*.  
Curr. Microbiol., 15: 277-281, 1987.

HERSCOWITZ, H.B.

In defense of the lung: paradoxical role of the pulmonary alveolar macrophage.  
Ann. Allergy, 55: 634-648, 1985.

HIGGINS, R.J.

Observations on recent changes in pig respiratory disease.  
Pig Vet. J., 31: 82-88, 1993.

IGLESIAS, G.; PIJOAN, C.

Effect of swine fever live vaccine on the mucociliary apparatus of swine and its interaction with *Pasteurella multocida*.  
Rev. Lat. Microbiol., 22: 52, 1980.

IGLESIAS, G.; PIJOAN, C.; MOLITOR, T.

Effects of Pseudorabies virus infection on alveolar macrophage functions.  
Proc. 10th IPVS Congress, Brasil, 1988.

IGLESIAS, G.; PIJOAN, C.; MOLITOR, T.

Interactions of Pseudorabies virus with swine alveolar macrophages I: virus replication.  
Arch. Virol., 104: 107-115, 1989.

IGLESIAS, J.G.; TRUJANO, M.; XU, J.

Inoculation of pigs with *Streptococcus suis* type 2 alone or in combination with Pseudorabies virus.  
Am. J. Vet. Res., 53 (3): 364-367, 1992.

ITO, T.; UEDA, M.J.; OKADA, T.S.; OHNISHI, S.I.

Phagocytosis by macrophages: II. The dissociation of the attachment and ingestion steps.  
J. Cell Sci., 51: 189-201, 1981.

JAKAB, G.J.; WARR, G.A.

Immune-enhanced phagocytic dysfunction in pulmonary macrophages infected with Parainfluenza 1 (Sendai) virus.  
Am. Rev. Resp. Dis., 124: 575-581, 1981.

JAKAB, G.J.

Viral-bacterial interactions in pulmonary infection.  
Adv. Vet. Sci. Comp. Med., 26: 155-171, 1982.

KASZA, L.; HODGES, R.T.; BETTS, A.O.; TREXLER, P.C.

Pneumonia in gnotobiotic pigs produced by simultaneous inoculation of a swine Adenovirus and *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Vet. Rec., 84: 262-267, 1969.

KUBO, M.; KIMURA, K.; KOBAYASHI, M.; SHIMIZU, M.; YAMADA, S.; MOROZUMI, T.; KOBAYASHI, H.; MITANI, K.; ITO, N.; YAMAMOTO, K.; MIURA, Y.; YAMAMOTO, T.; WATANABE, K.

Pathological studies on natural and experimental porcine pneumonia caused by Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) virus.

J. A. R. Q., 29 (3): 201-205, 1995.

MOLITOR, T.W.

Secondary infections associated with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus.

Proc. 25th Ann. Meet. AASP, 236-238, 1994.

NARITA, M.; KAWASHIMA, K.; MATSUURA, S.; UCHIMURA, A.; MIURA, Y.

Pneumonia in pigs infected with Pseudorabies virus and *Haemophilus parasuis* serovar 4.

J. Comp. Pathol., 110 (4): 329-339.

NICOLET, J.

Nuevas tendencias en enfermedades respiratorias del cerdo.

Proc. SEPOR-93, Inter. Symp. Pig Prod, 39-55, 1993.

PABST, R.; BINNS, R.M.

The immune system of the respiratory tract in pigs.

Vet. Immunol. Immunopathol., 43: 151-156, 1994.

PLJOAN, C.; OCHOA, G.

Interaction between a Hog Cholera vaccine strain and *Pasteurella multocida* in the production of porcine pneumonia.

J. Comp. Pathol., 88: 167-170, 1978.

PLJOAN, C.; CAMPOS, M.; OCHOA, G.

Effect of a hog cholera vaccine strain on the bactericidal activity of porcine alveolar macrophages.

Rev. Lat. Microbiol., 22: 69-71, 1980.

PLJOAN, C.

Mecanismos de defensa pulmonares.

En: Bloque de Patología del Máster de Patología y Producción Porcina, Barcelona, 1993.

PLJOAN, C.; SOLANO, G.; SEGALÉS, J.

PRRS virus and secondary disease.

Proc. Allen D. Lemay Conf., 225-226, 1994.

PLAGEMANN, P.G.W.; MOENNING, V.

Lactate dehydrogenase-elevating virus, equine arteritis virus, and simian hemorrhagic fever virus: a new group of positive-strand RNA viruses.

Adv. Vir. Res., 41: 99-192, 1992.

PLANA-DURÁN, J.; VAYREDA, M.; PEY, T.

Análisis de los resultados de una vacuna contra los procesos respiratorios del cerdo.

Med. Vet., 2 (11): 547-564, 1985.

POINTON, A.; DAVIES, P.; DIAL, G.D.; MARSH, W.

Recording and reporting data.

PigMON slaughter inspection procedures manual, University of Minnesota Swine Group, 1992.

POL, J.M.A.; VAN DIJK, J.E.; WENSVOORT, G.; TERPSTRA, C.

Pathological, ultrastructural, and immunohistochemical changes by Lelystad virus in experimentally induced infections of mystery swine disease (synonym: porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS)).  
Vet. Q., 13: 137-143, 1991.

RAMIREZ, M.J.

The effect of different strains of pseudorabies virus on phagocytosis and killing of different serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by porcine alveolar macrophages.  
MS Thesis, University of Minnesota, 1990.

SHOPE, R.

Swine Influenza.

J. Exp. Med., 54: 373-385, 1931.

SLAUSON, D.O.

The mediation of pulmonary injury.

Adv. Vet. Sci. Comp. Med., 26: 99-153, 1982.

STRAW, B.

Controlling pneumonia in swine herds.

Vet. Med., Jan., 78-86, 1992.

UEDA, M.J.; ITO, T.; OHNISHI, S.I.; OKADA, T.S.

Phagocytosis by macrophages: I. Kinetics of adhesion between particles and phagocytes.

J. Cell Sci., 51: 173-181, 1981.

VECHT, U.; ARENDS, M.D.; VAN DER MOLEN, E.J.; VAN LEENGOED, L.A.M.G.

Difference in virulence between two strains of *Streptococcus suis* type II after experimentally induced infection of new-germ free pigs.

Am. J. Vet. Res., 50: 1037-1043, 1989.

WARSHAUER, D.; GOLDSTEIN, E.; AKERS, T.; LIPPERT, W.; KIM, M.

Effect of Influenza viral infection on the ingestion and killing of bacteria by alveolar macrophages.

Am. Rev. Resp. Dis., 115: 269-277, 1977.

**CAPÍTULO 4:**

**ASOCIACIÓN *IN VIVO* ENTRE EL  
VIRUS DEL PRRS Y  
*Haemophilus parasuis***



## 4.1 INTRODUCCIÓN

El uso reciente de nuevas técnicas de producción porcina tales como el destete precoz medicado, producción en múltiples sitios y trabajo en lotes de animales fisiológica e inmunológicamente similares ha supuesto una mejora muy notable en el estado sanitario de la cabaña porcina, pero a la vez ha llevado a la obtención de animales mucho más susceptibles a la infección por múltiples gérmenes (Wiseman et al., 1989; Kirk Klark et al., 1994).

Las observaciones clínicas de los últimos años concuerdan con un incremento de ciertas enfermedades o entidades patológicas asociadas a la aparición de una nueva enfermedad caracterizada por provocar síntomas respiratorios en animales de todas las edades, especialmente en transición, y alteraciones reproductivas: Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS) (Benfield et al., 1992; Collins y Rossow, 1993).

Se ha sugerido que el virus del PRRS predispone a los cerdos a sufrir infecciones secundarias debido a su efecto sobre los mecanismos de defensa inespecíficos de las vías respiratorias: inflamación de la mucosa nasal y destrucción de macrófagos alveolares (Molitor, 1993; Pijoan et al., 1994).

Uno de los cuadros que se ha descrito clínicamente como de mayor auge relacionado con el PRRS ha sido el de poliserositis fibrinosa asociada a la infección con *Haemophilus parasuis* (Pijoan et al., 1994; Vahle et al., 1994, 1995). No obstante, la evidencia clínica no es suficiente como para caracterizar adecuadamente una supuesta interacción vírico-bacteriana. El objetivo de este trabajo es el de demostrar si realmente existe esta interacción entre el virus del PRRS y *Haemophilus parasuis* y, en el caso de que exista, intentar caracterizar los mecanismos patogénicos de esta asociación a partir de las lesiones macro y microscópicas que se produzcan y técnicas de detección de antígeno.

## 4.2 MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.2.1 Modelo experimental *in vivo* de interacción entre PRRSv y *Haemophilus parasuis* con cerdos convencionales libres de PRRS (Experimento 1).

**Animales:** Se utilizaron 12 cerdos convencionales de 4 semanas de edad y de ambos sexos procedentes de una granja declarada libre de PRRS. El día de llegada fueron repartidos aleatoriamente en dos naves aisladas, identificados con crotales correlativos del n° 276 al 287 y sangrados.

**Inóculo vírico:** Para la infección de los animales se utilizó la cepa de referencia americana del PRRSv, VR 2332, con 3 pases de cultivo celular en línea continua CL 2621 y en dilución de  $10^{4.6}$  TCID<sub>50</sub>/ml. La inoculación se realizó vía intranasal a través de un método de catéter-aspersión con 2 ml. de la suspensión vírica citada.

**Inóculo bacteriano:** Se utilizó una solución compuesta por una mezcla en partes iguales de dos cepas de *Haemophilus parasuis*: cepa 29755, de serovar 5, procedente de los laboratorios de Iowa State University (Ames, IA, Estados Unidos), y de demostrada virulencia (Rapp-Gabrielson y Gabrielson, 1992), y cepa 5992, de serovar desconocido, procedente del aislamiento de un caso de campo de un cerdo con meningitis fibrinosa y cedida por el Minnesota Veterinary Diagnostic Laboratory (Universidad de Minnesota, St. Paul, MN, Estados Unidos). Se utilizó una dosis única de  $10^8$  Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/ml., y la inoculación fue realizada vía intranasal por catéter-aspersión, vía intratraqueal por inyección directa en traquea o vía intraperitoneal por inyección directa en cavidad abdominal, según grupo, con 1 ml. de la suspensión bacteriana.

**Diseño experimental:** Los animales fueron divididos en dos grupos (A y B), con 9 animales el primero y 3 el segundo. A los 3 días de la llegada, los animales del grupo A fueron inoculados con el PRRSv, a excepción de uno de ellos (n° 279) en el cual se intentó determinar la posible infección por contacto con el resto de animales, y los animales del grupo B fueron inoculados con placebo. Seis días PI vírica fué inoculada la bacteria en dilución única por las tres vías anteriormente citadas (3 animales por vía de inoculación); los 3 animales del grupo B fueron

inoculados uno por vía I.N., uno por vía I.T. y el tercero por vía I.P. Los animales del grupo A fueron sacrificados a los 3, 5 y 7 días PI bacteriana, y los del grupo B uno fue sacrificado a los 5 días y el resto a los 7 días PI bacteriana. Los animales fueron revisados clínicamente cada día y se tomó la temperatura rectal de todos ellos durante el período experimental. Se realizó extracción de sangre a los 7 días PI vírica y el día de sacrificio con el objeto de realizar pruebas de serología y aislamiento vírico. El diseño experimental se muestra resumido en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Esquema del diseño experimental realizado para el modelo de reproducción *in vivo* de interacción entre el PRRSv y *H. parasuis* en cerdos convencionales libres de PRRS (Experimento 1)

GRUPO	TIPO DE INOCULACIÓN*	ANIMAL N°	DIA DE NECROPSIA***
A	I.N.	277	3
		282	5
		284	7
	I.T.	276	3
		279**	5
		280	7
	I.P.	278	3
		281	5
		283	7
B	I.N.	285	5
	I.T.	286	7
	I.P.	287	7

\* Inoculación bacteriana: I.N. = inoculación vía intranasal; I.T. = inoculación vía intratraqueal; I.P. = inoculación vía intraperitoneal.

\*\* Cerdo no inoculado con PRRSv. Contacto con el resto de animales.

\*\*\* Días PI bacteriana.

**Anatomía Patológica / Histopatología:** Los animales fueron necropsiados por una técnica rutinaria de necropsia obteniendo las muestras para microbiología con la mayor esterilidad posible. Para su posterior examen histopatológico se recolectaron muestras de cerebro, cornetes nasales, pulmón, corazón, hígado, riñón, bazo, tonsila, timo, ganglios linfáticos submandibulares,

retrofaringeos y mesentéricos, y intestino. Estos tejidos fueron fijados en formalina tamponada al 10%, deshidratados en serie creciente de alcoholes, embebidos en parafina, cortados en secciones de 4  $\mu\text{m}$ . de ancho y teñidos con hematoxilina/eosina (H/E).

**Inmunocitoquímica de PRRSv:** A los tejidos correspondientes a los animales inoculados con PRRSv se les aplicó una técnica de avidina-biotina-peroxidasa para la detección del virus, descrita previamente en la literatura (Halbur et al., 1994). Brevemente, los tejidos fijados en formol y embebidos en parafina fueron cortados en secciones de 5  $\mu\text{m}$ . y situados en portaobjetos con adherente (3-(trietoxisilil)-propilamina). Inicialmente se realizó la inhibición de la peroxidasa endógena en una solución del 3% de agua oxigenada al 33% en metanol durante 30 minutos. Posteriormente se realizó un tratamiento enzimático con Proteasa tipo XIV (P-5147, Sigma) al 0.1% durante 8 minutos. Se utilizó como antisuero primario a dilución 1:1000 el antisuero monoclonal SDOW 17, que reconoce específicamente una proteína codificada por el ORF 7 de la cepa americana del PRRSv (Nelson et al., 1993). La incubación con el antisuero primario se realizó durante 12-14 horas a 4°C de temperatura. Los antisueros secundarios (cabra anti-ratón biotinilado) y terciario (complejo avidina-biotina-peroxidasa) se utilizaron a diluciones de 1:200 y 1:100, respectivamente, ambos con incubación de 50 minutos a temperatura ambiente. Se efectuó un revelado de 8 minutos con una solución de 3,3',4,4'-Tetraaminobifenil (3,3'-Diaminobenzidina (DAB)) (120 mg. DAB/200 ml. tampón salino fosfato (TBS)) y agua oxigenada al 33% (120  $\mu\text{l}$ . añadidos a la solución anterior). Se utilizaron los tejidos de los animales no inoculados con PRRSv como controles negativos para esta técnica.

**Inmunocitoquímica de *Haemophilus parasuis*:** A los tejidos correspondientes a los animales inoculados con *H. parasuis* se les aplicó una técnica de avidina-biotina-peroxidasa para la detección de la bacteria. Los tejidos fijados en formol y embebidos en parafina fueron cortados en secciones de 5  $\mu\text{m}$ . y situados en portaobjetos con adherente (3-(trietoxisilil)-propilamina). Inicialmente se realizó la inhibición de la peroxidasa endógena en una solución del 3% de agua oxigenada al 33% en metanol durante 30 minutos. Se utilizó como antisuero primario a dilución 1:1500 un antisuero policlonal anti-*H. parasuis* serovar 5 cepa Nagasaki (cedido por A. Méndez-Trigo, Laboratorios Oxford, Worthington, MN, Estados Unidos). Este antisuero fue previamente adsorbido con polvo de hígado de cerdo a concentración de 100 mg/ml. durante 5 minutos con el

objeto de reducir la reacción de fondo inespecífica. La incubación con el antisuero primario se realizó durante 12-14 horas a 4°C de temperatura. Los antisueros secundarios (cabra anti-conejo biotinilado) y terciario (complejo avidina-biotina-peroxidasa) se utilizaron a diluciones de 1:400 y 1:100, respectivamente, ambos con incubación de 50 minutos a temperatura ambiente. Se efectuó un revelado de 2 minutos con una solución de DAB (120 mg. DAB/200 ml. TBS) y agua oxigenada al 33% (120 µl. añadidos a la anterior solución). Como controles negativos se utilizaron los animales no inoculados con la bacteria correspondientes al experimento 3.

**Virología:** A las muestras de suero correspondientes al día de llegada, 7 días PI vírica y día de necropsia se les aplicó una técnica de serología y aislamiento vírico. También se aplicó la técnica de aislamiento vírico a una mezcla de tejidos que contenía pulmón, bazo, tonsila y ganglios linfáticos mesentéricos y retrofaríngeos. La técnica serológica utilizada fue el Test de Inmunofluorescencia Indirecta (IFA) previamente descrita en la literatura (Yoon et al., 1992a), y el aislamiento vírico fue realizado en cultivos de PAM y/o células de la línea MARC-145 midiéndose el efecto citopático causado y realizando inmunofluorescencia sobre ellos (Bautista et al. 1993, Kim et al. 1993).

**Bacteriología:** Brevemente, hisopos de meninges, líquido pericárdico, líquido abdominal, líquido articular, cavidad nasal y pulmón fueron cultivados en placas de Ágar-sangre con una estría madre de *Staphylococcus aureus* y en placas de Ágar-chocolate. El hisopo nasal también fue cultivado en medio PPLO enriquecido con NAD y adicionado con Bacitracina y Lincomicina. Todos los cultivos realizados se incubaron en estufa con 5% de CO<sub>2</sub> durante 60 horas a 37°C. Las colonias obtenidas fueron testadas bioquímicamente a través de las pruebas de la ureasa, crecimiento dependiente de NAD, tinción de gram, test del ácido levulínico, oxidasa y catalasa.

#### **4.2.2 Modelo de reproducción experimental de la infección por *Haemophilus parasuis* en cerdos convencionales libres de PRRS (Experimento 2).**

**Animales:** Se utilizaron 16 cerdos convencionales de 3 semanas de edad y de ambos sexos procedentes de una granja declarada libre de PRRS. El día de llegada fueron repartidos

aleatoriamente en dos naves aisladas, identificados con crotales correlativos del n° 351 al 366, sangrados y se les tomó un hisopo nasal a la mitad de los animales de cada grupo (escogidos aleatoriamente) para intentar aislar la bacteria.

**Inóculo bacteriano:** Se utilizaron 2 cepas de *H. parasuis*: cepa 29755, de serovar 5, procedente de los laboratorios de Iowa State University (Ames, IA, Estados Unidos), y cepa 42088, de serovar 4, cedida por Laboratorios Oxford (Worthington, MN, Estados Unidos). Se utilizaron 2 dosis por grupo:  $10^2$  y  $10^5$  UFC/ml. La inoculación fue realizada vía intranasal por catéter-aspersión en la mitad de los animales de cada grupo y vía intratraqueal a través de broncoscopio en la otra mitad, con 1 ml. de la suspensión bacteriana.

**Diseño experimental:** Los animales fueron divididos en dos grupos (A y B), con 8 animales cada grupo. Los animales del grupo A fueron inoculados con la cepa 29755 y los del grupo B con la cepa 42088. De cada grupo, la mitad de los animales fueron inoculados con una dosis baja ( $10^2$  UFC/ml.) y la otra mitad con la dosis superior ( $10^5$  UFC/ml.). El sacrificio de los animales se realizó a los 4 y 8 días PI bacteriana, atendiendo según cepa, dosis y vía de inoculación. Los animales fueron revisados clínicamente cada día y se tomó temperatura rectal de todos ellos durante el experimento. El esquema del diseño experimental se muestra en la Tabla 2.

**Anatomía Patológica / Histopatología:** Se recogieron las mismas muestras que en el experimento 1, con el mismo tipo de procesado.

**Inmunocitoquímica de *Haemophilus parasuis*:** En los mismos términos expuestos para el experimento 1.

**Virología:** En los mismos términos expuestos para el experimento 1, con la diferencia de que solo hubo una extracción de sangre el día de la llegada de los animales y muestras de sangre y tejidos correspondientes al día de la necropsia.

**Bacteriología:** En los mismos términos expuestos para el experimento 1, con la salvedad de que se utilizó líquido cefalorraquídeo en lugar de hisopo de meninges.

**Tabla 2.** Esquema del diseño experimental realizado para el modelo de reproducción de la infección por *H. parasuis* en cerdos convencionales libres de PRRS (Experimento 2).

GRUPO	TIPO DE INOCULACIÓN*	DOSIS**	ANIMAL N°	DÍA DE NECROPSIA***
A	I.N.	$10^2$	351	4
			358	8
		$10^5$	354	4
			353	8
	I.T.	$10^2$	355	4
			352	8
		$10^5$	356	4
			357	8
B	I.N.	$10^2$	363	4
			366	8
		$10^5$	361	4
			359	8
	I.T.	$10^2$	365	4
			362	8
		$10^5$	364	4
			360	8

\* I.N. = inoculación vía intranasal; I.T. = inoculación vía intratraqueal

\*\* Dosis expresada en unidades formadoras de colonias (UFC) por ml.

\*\*\* Días PI bacteriana.

#### 4.2.3 Modelo experimental *in vivo* de interacción entre PRRSv y *Haemophilus parasuis* con cerdos convencionales libres de PRRS y *H. parasuis* (Experimento 3).

**Animales:** Se utilizaron 30 cerdos convencionales de entre 9 y 12 días de edad y de ambos sexos procedentes de 5 camadas distintas de una granja declarada libre de PRRS y de *H. parasuis*. El día

de llegada fueron repartidos aleatoriamente en cuatro naves aisladas, identificados con crotales correlativos del n° 1 al 33 (con ausencia de los n° 7, 25 y 26) y sangrados.

**Inóculo viral:** Para la infección de los animales se utilizó la cepa de referencia americana del PRRSv, VR 2332, con 3 pases de cultivo celular en línea continua CL 2621 y en dilución de  $10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml. La inoculación se realizó vía intranasal a través de un método de catéter-aspersión con 1 ml. de la suspensión vírica citada.

**Inóculo bacteriano:** Se utilizó la cepa 29755 de *H. parasuis*, de serovar 5. Se utilizó una dosis única de  $10^7$  UFC/ml., y la inoculación fue realizada vía intratraqueal a través de broncoscopio, con 1 ml. de la suspensión bacteriana.

**Diseño experimental:** Los animales fueron divididos en cuatro grupos (A, B, C y D), con 10 animales para los grupos A y B, y 5 animales para los grupos C y D. Durante los 6 días previos al inicio del experimento los animales fueron mantenidos con una dieta especial suplementada con antibióticos (Oxitetraciclina y Neomicina). Los animales fueron inoculados acorde con el esquema mostrado en la Tabla 3.

A los 4 días de la llegada, los animales de los grupos A y C fueron inoculados con el PRRSv. Cinco días PI vírica fué inoculada la bacteria en dilución única vía I.T. a los animales de los grupos A y B. La fecha teórica de sacrificio de los animales fué a los 5 días PI bacteriana; no obstante, algunos animales, por su condición crítica basada en postración, hipotermia y síntomas nerviosos centrales, fueron eutanasiados previamente a la fecha prevista. Los animales fueron revisados clínicamente cada día y se tomó la temperatura rectal de todos ellos durante el período experimental. Se realizó extracción de sangre el día de llegada de los animales, el día de inoculación bacteriana y día de necropsia.



**Tabla 3.** Esquema del diseño experimental realizado para el modelo de reproducción *in vivo* de interacción entre el PRRSv y *H. parasuis* en cerdos convencionales libres de PRRS y *H. parasuis* (Experimento 3).

GRUPO	Nº CERDOS / GRUPO	INÓCULO PRRSv	INÓCULO <i>H. parasuis</i>	DÍA DE NECROPSIA *
A	10	SI	SI	10**
B	10	NO	SI	10**
C	5	SI	NO	10
D	5	NO	NO	10

\* Desde el día 0 de experimentación.

\*\* Fecha prevista de eutanasia.

**Anatomía Patológica / Histopatología:** Se recogieron las mismas muestras que en el experimento 1, con el mismo tipo de procesado.

**Inmunocitoquímica de PRRSv:** En los mismos términos expuestos para el experimento 1.

**Inmunocitoquímica de *Haemophilus parasuis*:** En los mismos términos expuestos para el experimento 1.

**Virología:** En los mismos términos expuestos para el experimento 1.

**Bacteriología:** En los mismos términos expuestos para el experimento 2.

**Test de inmunofluorescencia de *Mycoplasma hyopneumoniae*:** Secciones congeladas procedentes de lóbulo medio pulmonar fueron usadas para realizar un test de Inmunofluorescencia Indirecta (Messier et al., 1989) con el objeto de determinar la presencia de *M. hyopneumoniae* usando un anticuerpo policlonal.

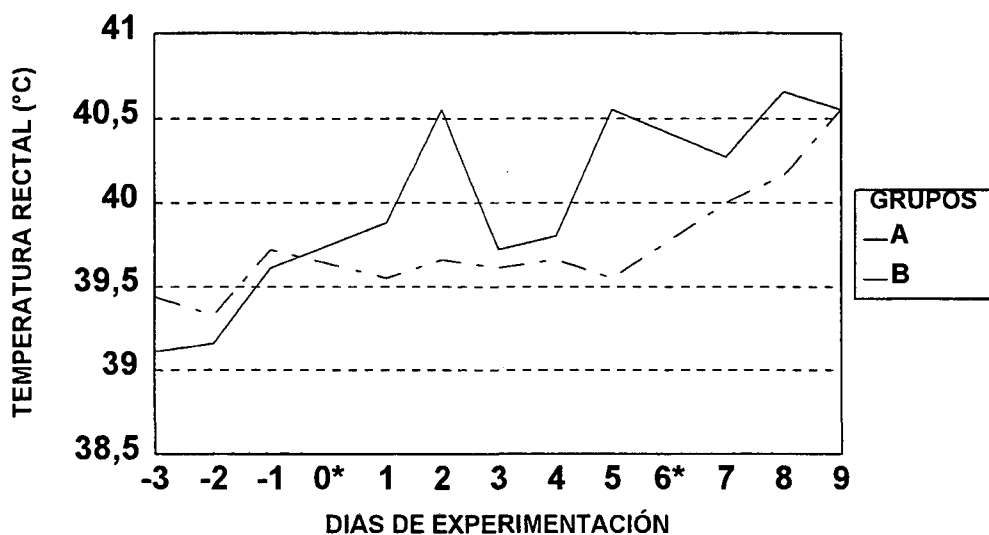
**Análisis estadístico:** Se usó el test de medidas repetidas de análisis de la varianza para el análisis de los datos de temperatura. Para la significancia lesional (meningitis y poliserositis) así como de la mortalidad se utilizó un modelo linear aditivo para datos categóricos de análisis de varianza.

### 4.3 RESULTADOS

#### 4.3.1 Modelo experimental *in vivo* de interacción entre PRRSv y *Haemophilus parasuis* con cerdos convencionales libres de PRRS (Experimento 1).

**Evaluación clínica:** Todos los animales sobrevivieron al período experimental. Los cerdos del grupo A presentaron una ligera hipertermia al segundo día PI vírica, aunque ésta fue muy leve comparada a la temperatura de los animales que no habían sido desafiados con el PRRSv (grupo B). Ambos grupos mostraron hipertermia entre el primer y tercer día PI bacteriana, aunque fue ligeramente superior en los animales del grupo A. En todos los casos los períodos de hipertermia coincidieron con pérdida del apetito, depresión de los animales y tendencia al hacinamiento. La evolución de las temperaturas rectales durante la fase experimental se muestra en la Figura 1.

**Figura 1.** Temperaturas rectales medias de los grupos de animales del Experimento 1 durante el período experimental.



**Anatomía Patológica:** Macroscópicamente no se apreció un cuadro de poliserositis en ninguno de los animales del experimento. Solamente un animal del grupo A (n° 283), de inoculación bacteriana intraperitoneal, mostró presencia de fibrina en la superficie de la pleura pulmonar de lóbulos medio y diafragmático del pulmón izquierdo (pleuritis fibrinosa unilateral). A nivel pulmonar, el animal n° 279 mostró cierto grado de consolidación pulmonar craneo-ventral, y el n° 276 presentó manchas de color grisáceo-rojizo repartidas por todo el parénquima pulmonar, dando un patrón de parcheado (neumonía lobulillar). Ambos animales correspondían al grupo A y fueron inoculados intratraquealmente con la bacteria.

Aparte de las lesiones pulmonares, en el animal n° 277 (grupo A) se presentó linfadenitis purulenta que interesaba al ganglio inguinal superficial derecho e hidronefrosis del riñón derecho; en el animal n° 278 (grupo A) se apreciaron unos puntos blanquecinos y endurecidos en la superficie e interior del músculo esterno-mastoideo; y en el animal n° 285 (grupo B) se presentó sinusitis frontal purulenta.

**Histopatología:** En mayor o menor grado, todos los animales del grupo A manifestaron una reacción pulmonar de tipo intersticial (neumonía intersticial), caracterizada por el engrosamiento de tabiques alveolares causado por el relleno de un infiltrado inflamatorio mononuclear (específicamente células macrofágicas y linfoplasmocitarias) (Figura 7) y la presencia de células inflamatorias del mismo tipo en el interior de los alveolos que, en algún caso, prácticamente llegaban a colapsar los alveolos (Figura 8). En algún animal se pudo observar una clara reacción inflamatoria mononuclear perivascular, peribronquiolar y peribronquial (Figura 9). Fenómenos de reepitelización, células sincitiales y hipertrofia de neumocitos tipo II, descritos en la literatura asociados a la infección por PRRSv, no fueron observados. En 3 de los animales (n° 276, 277 y 284) esta neumonía intersticial fue leve, y en el resto de los animales fue más severa.

En 2 de los 3 animales del grupo B (n° 286 y 287) se pudo observar en mayor grado del normal la presencia de células de morfología macrofágica en el interior de alveolos, sin presentarse un patrón neumónico.

En el grupo A, el animal n° 279 mostró áreas de infiltrado inflamatorio básicamente polimorfonuclear con afectación bronquial y bronquiolar (bronconeumonía catarral-purulenta) (Figura 10), y el animal n° 283 mostró un foco con gran reacción inflamatoria de carácter celular mixto con zonas de fibrosis, fibrina y pus afectando a pulmón y pleura (pleuroneumonía fibrino-purulenta).

Otras lesiones observadas fueron:

\* rinitis purulenta (presencia de exudado purulento en la superficie de la mucosa nasal, con aumento de células mononucleares en la submucosa) (Figura 11):

Grupo A: n° 276, 277 y 281.

\* nefritis intersticial multifocal leve (ligera presencia de infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario en el intersticio del córtex renal):

Grupo A: n° 277.

Grupo B: n° 287.

\* enteritis catarral ligera (presencia de ligero exudado inflamatorio linfoplasmocitario en la mucosa del yeyuno).

Grupo A: n° 278.

\* despoblación linfocitaria de ganglios linfáticos (áreas con disminución de concentración de células linfoides en ganglios linfáticos cervicales):

Grupo A: n° 280.

\* calcificaciones nodulares en músculo esterno-mastoideo:

Grupo A: n° 278.

**Inmunocitoquímica de PRRSv:** Se apreció marcaje positivo en tejido pulmonar en 6/9 animales (Figura 12), en tonsila de 1/9 animales (cerdo n° 280) (Figura 13) y en placas de Peyer en 1/9 animales (cerdo n° 278) (Figura 14) (tabla 4). El resto de órganos de los animales inoculados con

PRRSv y los órganos correspondientes a animales inoculados exclusivamente con bacteria no mostraron marcaje positivo. A nivel pulmonar se observó marcaje en el citoplasma de macrófagos alveolares y intersticiales. El nivel de marcaje fue muy bajo; en algunos casos solo se observaron de 3-10 células positivas por pulmón valorado, y con 3-4 cortes por pulmón. El marcaje en tonsila y en placas de Peyer apareció en células que correspondían a morfología macrofágica, y en un bajo número.

**Tabla 4.** Resultado inmunocitoquímico de PRRSv correspondiente a los animales del grupo A del Experimento 1.

ANIMAL N°	PULMÓN	TONSILA	PL. PEYER
276	+	-	-
277	+	-	-
278	-	-	+
279	-	-	-
280	+	+	-
281	+	-	-
282	+	-	-
283	+	-	-
284	-	-	-

**Inmunocitoquímica de *H. parasuis*:** No se observó marcaje específico en ninguno de los tejidos estudiados.

**Virología:** Los sueros iniciales revelaron serología y aislamiento negativo para PRRSv. Los resultados serológicos correspondientes al día de sacrificio, así como el aislamiento vírico en los sueros obtenidos ese mismo día se muestran en la tabla 5. Los resultados de aislamiento de virus en tejido y la serología de los animales a los 7 días PI vírica fueron negativos.

**Bacteriología:** Los resultados de aislamiento selectivo de *H. parasuis* practicado en los órganos y fluidos comentados fueron negativos.

**Tabla 5.** Resultados virológicos de los cerdos de los grupos A y B del Experimento 1.

Grupo	Animal N°	ECP 7 Días PI <sup>1</sup>	Serología Sacrif. <sup>2</sup>	ECP Sacrificio <sup>3</sup>
A	276	+	1:256	+
	277	-	1:1024	+
	278	+	1:1024	+
	279	+	-	+
	280	+	1:1024	-
	281	+	1:64	-
	282	+	1:1024	-
	283	+	1:1024	-
	284	+	1:256	+
B	285	-	-	-
	286	-	-	-
	* 287	-	-	- <sup>4</sup>

<sup>1</sup> Efecto citopático correspondiente a sueros de los animales a los 7 días PI vírica.

<sup>2</sup> Resultados de serología por IFA correspondientes a los sueros del día de sacrificio.

<sup>3</sup> Efecto citopático correspondiente a sueros de los animales al día de sacrificio.

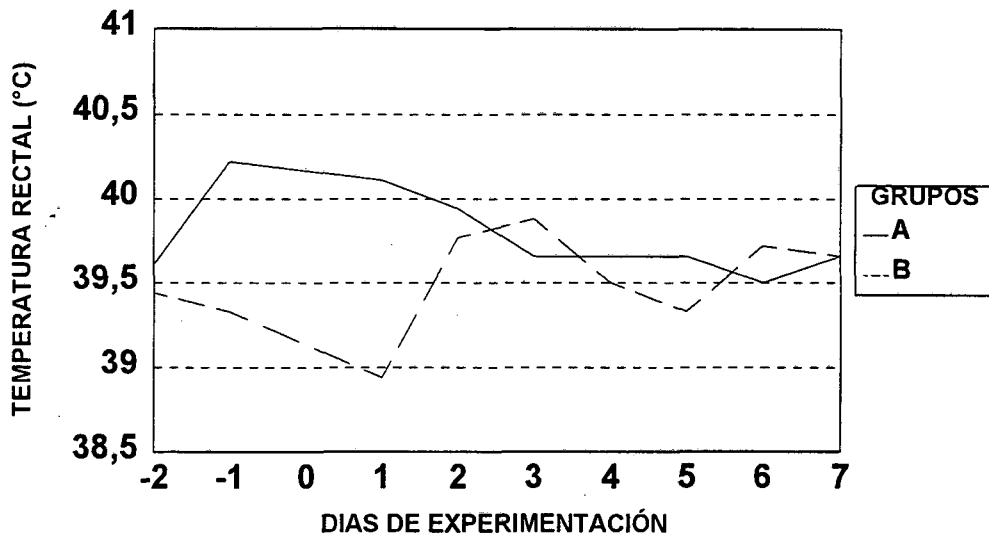
<sup>4</sup> En este animal si fue observado efecto citopático positivo, pero no fue debido a PRRSv.

#### 4.3.2 Modelo de reproducción experimental de la infección por *Haemophilus parasuis* en cerdos convencionales libres de PRRS (Experimento 2).

**Evaluación clínica:** Las temperaturas medias de los dos grupos no mostraron alteraciones ostensibles durante el período experimental. No obstante, de forma individual, 3 animales manifestaron síntomas de hipertermia, depresión y anorexia. El animal n° 356 (grupo A, dosis de 10<sup>5</sup> UFC/ml. y inoculación I.T.) empezó a mostrar estos síntomas al día siguiente de la inoculación bacteriana; a los 2 días PI se encontró en decúbito lateral y con síntomas aparentemente de origen central, por lo cual se optó por sacrificarlo y necropsiarlo. El animal n° 361 (grupo B, dosis de 10<sup>5</sup> UFC/ml. y inoculación I.N.) mostró una ligera hipertermia a los 3 días PI, con claros síntomas de depresión y anorexia el día de sacrificio (4 días PI). El animal n° 359 (grupo B, dosis de 10<sup>5</sup> UFC/ml. y inoculación I.N.) se encontró con ligera hipertermia 3 días PI bacteriana, y postrado con síntomas de origen central el día 5 PI bacteriana, por lo que se optó por sacrificar y necropsiar.

La evolución de las temperaturas medias de los grupos A y B se muestra en la Figura 2.

**Figura 2.** Temperaturas rectales medias de los grupos de animales del Experimento 2 durante el período experimental.



\* El día 0 corresponde al día de inoculación bacteriana

**Anatomía Patológica:** Un animal de cada grupo de experimentación desarrolló lesiones compatibles con la enfermedad de Glässer.

El cerdo n° 356 (grupo A) mostró un exudado fibrinoso depositado en serosas pleural (Figura 5), pericárdica, hepática, esplénica, mesentérica y articulares, con presencia masiva de líquido amarillento y translúcido en cavidades torácica y abdominal (poliserositis y poliartritis fibrinosa). El pulmón presentaba adherencias a la pleura costal y pequeñas áreas de consolidación en los lóbulos medios. No se apreció ningún tipo de lesión encefálica.

El cerdo n° 361 (grupo B) presentó exudado fibrinoso depositado en serosas hepática, esplénica, mesentérica y articular, con masiva presencia de líquido amarillento y translúcido en cavidad abdominal (peritonitis (Figura 4) y poliartritis fibrinosa). No se apreció ningún tipo de lesión encefálica.

El cerdo n° 359 (grupo B), a pesar de presentar una sintomatología evidente y ser sacrificado por ello, no presentó ningún tipo de lesión macroscópica.

En el grupo B, el animal n° 364 (dosis de  $10^5$  UFC/ml. y inoculación I.T.) presentó un pequeño anillo de consolidación pulmonar alrededor del lóbulo medio del pulmón derecho, y el cerdo n° 365 (dosis  $10^2$  UFC/ml. y inoculación I.T.) presentó edema pulmonar.

**Histopatología:** El acúmulo de exudado fibrinoso en las superficies serosas de los animales n° 356 (grupo A) y 361 (grupo B) se caracterizó por la presencia de una gran cantidad de fibras de fibrina entrelazadas entre ellas y conteniendo una cantidad variable de exudado inflamatorio celular en el cual predominaba el polimorfonuclear neutrófilo (Figuras 15 y 16). En algún caso se logró observar la presencia de colonias bacterianas en las superficies serosas. En solo uno de los dos casos (cerdo n° 356) se pudo apreciar alteración meníngea

En los animales n° 356 (grupo A) y 364 (grupo B) se pudo apreciar áreas focales de infiltrado inflamatorio básicamente polimorfonuclear con obstrucción de bronquios y bronquiolos (bronconeumonía catarral-purulenta). El animal n° 365 (grupo B) presentó un manifiesto edema pulmonar.

No se observaron lesiones microscópicas en otros órganos.

**Inmunocitoquímica de *H. parasuis*:** Se apreció marcaje positivo en tejidos correspondientes a los animales n° 356 (grupo A) y n° 361 (grupo B) (tabla 6). El marcaje positivo en ambos casos se circunscribió al citoplasma de células de aspecto macrofágico contenidas en los exudados fibrino-purulentos de las vísceras afectadas, y de forma difusa por estos exudados inflamatorios (Figuras 17 y 18). No obstante, en ambos casos, pudo detectarse un mínimo marcaje positivo en células macrofágicas de las Placas de Peyer y ganglios linfáticos, no asociadas a inflamación de estos órganos. El resto de tejidos correspondientes a los animales no afectados de poliserositis fibrinosa fueron negativos a la técnica inmunocitoquímica.



**Tabla 6.** Resultado inmunocitoquímico de *Haemophilus parasuis* correspondiente a los animales n° 356 (grupo A) y n° 361 (grupo B) del Experimento 2.

TEJIDO	CERDO N° 356	CERDO N° 361
ENCEFALO	+	-
PULMON	-	-
PLEURA	+	-
PERICARDIO	+	-
CÁPSULA HEPÁTICA	+	+
CÁPSULA ESPLÉNICA	+	+
PERITONEO	+	+

**Virología:** Todos los sueros testados para serología y aislamiento del PRRSv, correspondientes al día de llegada de los animales y al día de sacrificio, resultaron negativos. También el aislamiento vírico de tejidos resultó negativo.

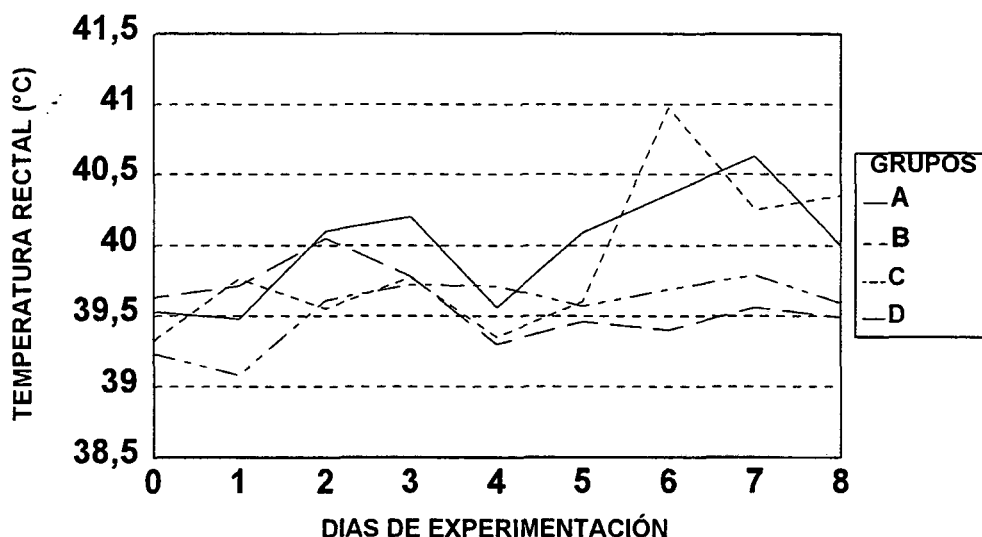
**Bacteriología:** Los hisopos nasales tomados en la llegada a algunos de los animales fueron negativos, pero a la necropsia se pudo aislar *H. parasuis* en 2/16 animales, concretamente en aquellos que macro y microscópicamente habían presentado lesiones de poliserositis (n° 356 y 361). Además, en 5/16 animales también se aislaron *Haemophilus* spp. (ureasa positivos) del pulmón.

#### 4.3.3 Modelo experimental *in vivo* de interacción entre PRRSv y *Haemophilus parasuis* con cerdos convencionales libres de PRRS y *H. parasuis* (Experimento 3).

**Evaluación clínica:** En cuanto a la temperatura rectal de los animales, se apreció una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre grupos; la temperatura media de los días 0, 4, 5, 6 y 7 del período experimental fue superior en los animales inoculados con la bacteria (grupos A y B) que en los animales controles negativos o inoculados con el PRRSv solamente. Un día después de la infección bacteriana (día 6 PI vírica), esta diferencia fue más evidente. Además, en el día 6 PI los animales del grupo B tuvieron una temperatura significativamente superior ( $p < 0.05$ ) que el resto

de grupos. Los grupos A y C también mostraron un aumento de temperatura rectal entre los días 1 y 3 PI vírica, pero éste no fue significativamente superior ( $p>0.05$ ) a la del resto de grupos. La evolución de las temperaturas medias de los grupos se muestra en la Figura 3.

**Figura 3.** Temperaturas rectales medias de los grupos de animales del Experimento 3 durante el período experimental.



\* El día 0 corresponde al día de inoculación vírica y el día 5 al de inoculación bacteriana

Síntomas clínicos evidentes como anorexia y depresión fueron mínimamente mostrados por los animales de los grupos A y C con posterioridad a la inoculación vírica, pero después de la inoculación bacteriana (grupos A y B), si fueron observados síntomas evidentes de anorexia, letargia, depresión y síntomas nerviosos de origen central tales como nistagmo, temblores y pataleo en decúbito. La severidad de estos síntomas fue mayor en los animales del grupo B.

En el grupo A (animales inoculados con virus y bacteria) aparecieron 3 animales (nº 9, 20 y 28) muertos de forma súbita, sin la previa aparición de síntomas de ningún tipo. Estos animales murieron durante la noche a los 2 (nº 20 y 28) y 3 (nº 9) días PI bacteriana. Ningún animal del grupo B murió de forma súbita, aunque el hecho de aparecer algunos de ellos con hipotermia, postración y síntomas nerviosos de origen central, fue el motivo de ser sacrificados en prevención

a muertes nocturnas que pudieran ocasionar la pérdida de muestras microbiológicas. Este hecho también se observó en algunos de los animales del grupo A. Concretamente, fueron sacrificados anteriormente a la fecha prevista de necropsia (6 días PI bacteriana) los animales:

Grupo A: n° 8 (2 días PI bacteriana)

n° 14, 15, 27 (3 días PI bacteriana)

n° 19 (4 días PI bacteriana)

Grupo B: n° 11, 16, 22, 26 (2 días PI bacteriana)

n° 3, 21, 30 (3 días PI bacteriana)

n° 4 (5 días PI bacteriana)

A pesar de que la mortalidad súbita fue del 30% (3/10) de los animales del grupo A y no se produjo en animales del grupo B, esta diferencia entre grupos no fue estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ).

**Anatomía Patológica:** En los grupos A y B hubo animales que desarrollaron lesiones típicas de la enfermedad de Glässer (Figura 6).

En el grupo A se pudo apreciar una intensa reacción inflamatoria de carácter predominantemente fibrinoso en la pleura (pleuritis fibrinosa) en el animal n° 19. A su vez, este presentó un líquido cefalorraquídeo relativamente turbio y con coloración blanquecina. El resto de los animales no manifestaron un proceso que afectara macroscópicamente a las serosas, pero se pudieron observar distintos hallazgos:

- \* presencia de filamentos de fibrina en peritoneo: n° 8, 14 y 20.
- \* presencia de filamentos de fibrina en cavidad pericárdica: n° 9 y 15.
- \* presencia de líquido articular turbio: n° 8, 14 y 27.
- \* presencia de líquido cefalorraquídeo turbio: n° 20 y 28.

También se detectaron pequeñas áreas de consolidación pulmonar craneo-ventrales en los animales n° 8 y 27.

En el grupo B se pudo apreciar una intensa reacción inflamatoria de carácter básicamente fibrinoso en distintas serosas de 7 de 10 animales, tal como se muestra en la tabla 7. Aparte de estas lesiones, también se pudo observar:

\* presencia de hilos de fibrina en pericardio y peritoneo: n° 29.

\* presencia de líquido articular turbio: n° 4, 22, 29 y 30.

\* presencia de líquido cefalorraquídeo turbio: n° 4, 11 y 22.

**Tabla 7.** Lesiones macroscópicas de serositis fibrinosa en los animales del grupo B del Experimento 3.

Animal N°	Pleuritis	Pericarditis	Perihepatitis	Periesplenitis	Serositis mesentérica
3	+	-	-	+	-
4	+	+	+	+	+
10	-	-	-	-	-
11	+	-	-	-	-
16	+	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-
21	+	-	-	-	-
22	+	-	+	-	-
29	-	-	-	-	-
30	+	+	-	+	-

También se observaron pequeñas áreas de consolidación pulmonar craneo-ventrales en los animales n° 11, 21, 29 y 30.

En los grupos C y D no se observaron animales con ningún tipo de lesión macroscópica, con excepción del cerdo n° 5, del grupo C, en el cual se le apreció una pequeña área de bronconeumonía en la parte apical del lóbulo medio izquierdo.

**Histopatología:** El estudio histopatológico confirmó los hallazgos de necropsia. Las serositis fibrinosas consistieron en la deposición de fibrina y una cantidad variable de células inflamatorias, especialmente células mononucleares, siendo un infiltrado mixto en los puntos donde el acúmulo celular fue mayor. La existencia de lesiones en las serosas dependió de cada animal, pero en conjunto fueron pleura y meninges las afectadas en animales del grupo A, y pleura (Figura 22), pericardio, peritoneo y meninges en animales del grupo B. Las lesiones de serositis excluyendo la afectación de meninges presentó una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) entre los animales del grupo A (un animal con pleuritis) y los del grupo B (7 animales con al menos una serosa afectada).

Lesiones de meningitis (Figuras 23), en algunos casos acompañadas de coroiditis (Figura 24) y ependimitis, caracterizadas por presencia de exudado fibrinoso y acúmulo de infiltrado inflamatorio básicamente mononuclear fueron observadas en 4 de 10 animales (40%) en el grupo A, y 5 de 10 animales en el grupo B (50%). La diferencia entre grupos no fue estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ).

Ninguno de los animales de los grupos C y D mostraron inflamación en serosas.

En todos los animales de los grupos A y C (grupos inoculados con PRRSv) se presentaron de ligeras a moderadas neumonías intersticiales caracterizadas por el aumento del grosor de los tabiques interalveolares y una leve infiltración de células de aspecto macrofágico en el interior de alveolos. Esporádicamente se pudo observar la presencia de células sincitiales en el interior de los alveolos (Figuras 19 y 20). Únicamente en el cerdo n° 31, con inoculación vírica, no se observó neumonía intersticial.

Otra de las lesiones observadas con cierta frecuencia en los animales inoculados con virus fue una leve a moderada despoblación linfocitaria en ganglios linfáticos (Figura 21); esta lesión fue observada en 3 de 10 animales en el grupo A (n° 19, 27 y 28) y 4 de 5 animales en el grupo C (n° 5, 12, 18 y 23). También se describió en el cerdo n° 10 del grupo B.

Otras lesiones observadas fueron:

\* rinitis catarral (con un aumento de celularidad en la submucosa y/o presencia de pequeños quistes epiteliales con células inflamatorias mononucleares en su interior):

Grupo A: n° 8, 9 y 14.

Grupo B: n° 11.

\* tonsilitis purulenta (con presencia ligera o moderada de células polimorfonucleares y con presencia ocasional de colonias bacterianas):

Grupo A: n° 9 y 28.

Grupo B: n° 4 y 29.

\* bronconeumonía catarral-purulenta (con presencia de infiltrado inflamatorio polimorfonuclear que colapsó alveolos, bronquios y bronquiolos):

Grupo A: n° 2, 8, 27 y 28.

Grupo B: n° 4, 11, 21, 29 y 30.

\* linfadenitis purulenta de ganglio linfático inguinal superficial (con intensa presencia de infiltrado inflamatorio básicamente polimorfonuclear distribuido por todo el parénquima): n° 30, del grupo B.

El cerdo n° 16 (grupo B) del experimento 3 presentó edema intersticial e infiltración de los tabiques interlobulillares con un componente inflamatorio fundamentalmente polimorfonuclear. Concomitantemente se observó una marcada distensión de los vasos linfáticos pleurales y del tabique interlobulillar, presentado un contenido inflamatorio formado casi exclusivamente por polimorfonucleares neutrófilos (Figura 25). Esta misma lesión, aunque de forma más moderada, también fue observada en el animal n° 30 (grupo B).

Los animales del grupo A que murieron de forma súbita (n° 9, 20 y 28) mostraron mínimas lesiones microscópicas. En los tres animales se detectó una congestión pulmonar muy intensa que acompañaba a las lesiones de neumonía intersticial (leves) y en uno de los animales (n° 9) se observó la presencia de hemorragias pulmonares. En estos mismos animales se observaron

fenómenos de coagulación intravascular diseminada (CID) en capilares pulmonares, siendo especialmente intensa en el cerdo n° 9 (Figura 26). En los animales 9 y 28 se detectó la presencia de colonias bacterianas en tonsilas.

Las lesiones microscópicas de los cerdos de los grupos A y B se encuentran detalladas en las tablas 8 y 9, respectivamente.

**Inmunocitoquímica de PRRSv:** Se detectó antígeno vírico en 6/10 animales del grupo A y 5/5 animales del grupo C (tabla 10). No se observó marcaje positivo en ninguno de los tejidos correspondientes a los animales de los grupos B y D. El antígeno fue detectado en macrófagos alveolares, aunque en muy bajo número; en células macrofágicas en el miocardio (Figura 27); en células de aspecto macrofágico en tonsila, timo y placas de Peyer; y, finalmente, en células inflamatorias tipo macrófago en exudado fibrinoso meníngeo. En todos los casos el nivel de marcaje entendido como número de células positivas a la técnica de inmunocitoquímica fue muy bajo.

**Inmunocitoquímica de *Haemophilus parasuis*:** Se apreció marcaje positivo en tejidos correspondientes a 9/10 cerdos del grupo A y a 8/10 cerdos del grupo B (tabla 11). No se observó marcaje en ninguno de los tejidos correspondientes a animales de los grupos C y D. El marcaje positivo se circunscribió, en la mayoría de los casos, al citoplasma de células de aspecto macrofágico contenidas en los exudados fibrino-purulentos de las vísceras afectadas, y de forma difusa por estos exudados inflamatorios (Figura 28, 31 y 32). Además, también se observaron células de aspecto macrofágico con antígeno en tonsila de 4/10 cerdos en el grupo A y 5/10 cerdos en el grupo II. En algunos animales (n° 9, 19 y 28 del grupo A, y n° 21 del grupo B) se observó presencia de antígeno distribuido multifocalmente en células mononucleares de la pulpa blanca del bazo (Figura 34), así como en células contenidas en capilares sanguíneos de corazón (Figura 33) e hígado (menos en el animal n° 28). En el pulmón se detectó antígeno bacteriano en 7/10 animales en ambos grupos, tanto de forma extensiva en el citoplasma de células inflamatorias en caso de neumonías como en el interior del citoplasma de macrófagos alveolares (Figura 29); la distribución del antígeno siempre fue multifocal y siguiendo un patrón lobulillar. En la pleura solo se observó marcaje positivo en animales del grupo B. Los pulmones con infiltración inflamatoria

en tabiques interlobulillares y distensión de vasos linfáticos también mostraron antígeno en el interior de las células inflamatorias (Figura 30). El resto de tejidos correspondientes a los animales no afectados de poliserositis fibrinosa resultaron negativos a la técnica inmunocitoquímica.

**Virología:** Los sueros iniciales revelaron serología y aislamiento negativos para PRRSv. Los resultados serológicos de los cerdos de los grupos A y C correspondientes al día de sacrificio (entre 7 y 11 días PI vírica), así como el aislamiento vírico en los sueros obtenidos el día de la necropsia se muestran en la tabla 12. El aislamiento de tejidos fue negativo.

**Bacteriología:** *H. parasuis* fue aislado en 9 de 10 animales (90%) tanto en el grupo de infección mixta vírico-bacteriana (grupo A) como en el grupo de infección bacteriana (grupo B) en el día de la necropsia. En los grupos C y D los aislamientos fueron negativos para todos los animales.

**Test de fluorescencia para *Mycoplasma*:** El test de anticuerpo fluorescente para la detección de *Mycoplasma hyopneumoniae* en los todos los animales que presentaron zonas de consolidación craneo-ventral resultó negativo.



en tabiques interlobulillares y distensión de vasos linfáticos también mostraron antígeno en el interior de las células inflamatorias (Figura 30). El resto de tejidos correspondientes a los animales no afectados de poliserositis fibrinosa resultaron negativos a la técnica inmunocitoquímica.

**Virología:** Los sueros iniciales revelaron serología y aislamiento negativos para PRRSV. Los resultados serológicos de los cerdos de los grupos A y C correspondientes al día de sacrificio (entre 7 y 11 días PI vírica), así como el aislamiento vírico en los sueros obtenidos el día de la necropsia se muestran en la tabla 12. El aislamiento de tejidos fue negativo.

**Bacteriología:** *H. parasuis* fue aislado en 9 de 10 animales (90%) tanto en el grupo de infección mixta vírico-bacteriana (grupo A) como en el grupo de infección bacteriana (grupo B) en el día de la necropsia. En los grupos C y D los aislamientos fueron negativos para todos los animales.

**Test de fluorescencia para *Mycoplasma*:** El test de anticuerpo fluorescente para la detección de *Mycoplasma hyopneumoniae* en los todos los animales que presentaron zonas de consolidación craneo-ventral resultó negativo.

**Tabla 8.** Lesiones microscópicas correspondientes al grupo A del Experimento 3.

Nº Cerdo del Grupo A	Neumonía Intersticial	Bronco-neumonía	Poliserositis							Rinitis Catarral	Despoblación linfocitaria en ganglios linfáticos
			Pleuritis	Pericarditis	Perihepatitis	Perisplenitis	Serositis Mesentérica	Meningitis			
1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
9	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
14	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
15	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
19	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
20	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
27	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
28	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+

+ = presencia de lesión

- = ausencia de lesión

Tabla 9. Lesiones microscópicas correspondientes al grupo B del Experimento 3.

Nº Cerdo Del Grupo B	Neumonía Intersticial	Bronco- neumonía	Poliserositis							Rinitis Catarral	Despoblación linfocitaria en ganglios linfáticos
			Pleuritis	Pericarditis	Perihepatitis	Periesplenitis	Serositis Mesentérica	Meningitis			
3	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
11	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
16	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
22	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
29	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
30	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-

+ = presencia de lesión

- = ausencia de lesión

**Tabla 10.** Resultado inmunocitoquímico de PRRSv correspondiente a los animales de los grupos A y C del experimento 3.

Grupo	Animal N°	Encéfalo	Pulmón	Miocardio	Hígado	Bazo	Tonsila	Timo	Placas de Peyer	Ganglios linfáticos	Riñón
A	1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	8	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	14	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	19	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+
	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	28	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Total grupo A		1/10	4/10	3/10	0/10	0/10	3/10	0/10	1/10	0/10	0/10
C	5	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
	12	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-
	18	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	23	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
	31	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-
Total grupo C		0/5	2/5	5/5	0/5	0/5	4/5	2/5	0/5	0/5	0/5

\*Detección de antígeno en el citoplasma de células mononucleares que forman parte del infiltrado inflamatorio meníngeo.

Tabla 11. Resultado inmunocitoquímico de *Haemophilus parasuis* correspondiente a los animales del grupo A y B del experimento 3.

Grupo	Animal N°	Encéfalo	Pulmón	Pleura	Pericardio	Cápsula hepática	Cápsula esplénica	Tonsila	Placas de Peyer	Ganglios linfáticos	Riñón
A	1	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	2	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	9	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	19	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+
	20	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	27	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+
	28	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
Total grupo A		5/10	7/10	0/10	3/10	2/10	4/10	4/10	1/10	0/10	3/10
B	3	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	11	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	16	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	21	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	22	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
	29	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
	30	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
Total grupo B		5/10	7/10	6/10	4/10	3/10	5/10	5/10	0/10	1/10	0/10

\* Detección de antígeno en citoplasma de células mononucleares situadas en el interior de vasos de distintos órganos.

# Detección de antígeno en citoplasma de macrófagos alveolares.

**Tabla 12.** Resultados virológicos de los cerdos de los grupos A y C (animales inoculados con PRRSv) del experimento 3.

Grupo	Animal N°	ECP 5 Dias PI <sup>1</sup>	Serologia Sacrif. <sup>2</sup>	ECP Sacrificio <sup>3</sup>
A	1	+	1:64	+
	2	+	1:1024	+
	8	+	1:64	-
	9	+	1:256	-
	14	+	1:256	-
	15	+	1:256	-
	19	+	1:256	-
	20	+	-	+
	27	+	-	-
28	+	-	-	
C	5	+	1:256	+
	12	-	1:256	-
	18	+	1:1024	-
	23	+	1:1024	+
	31	-	-	-

<sup>1</sup> Efecto citopático correspondiente a sueros de los animales a los 5 días PI vírica.

<sup>2</sup> Resultados de serología por IFA correspondientes a los sueros del día de sacrificio.

<sup>3</sup> Efecto citopático correspondiente a sueros de los animales al día de sacrificio.

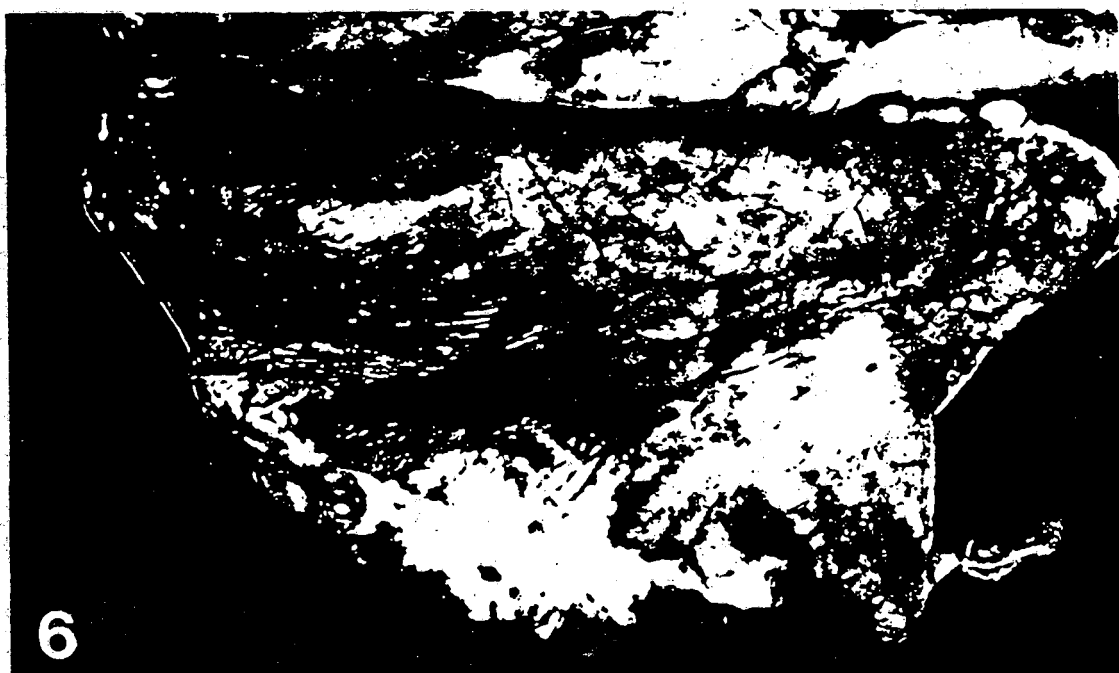


Figura 4. Peritoneo. Peritonitis fibrinosa desarrollada por un un cerdo convencional libre de PRRSv inoculado intranasalmente con *H. parasuis* (cepa 42088) a dosis de  $10^5$  UFC. Cerdo n° 361 (experimento 2).

Figura 5. Pulmón. Pleuritis fibrinosa desarrollada por un cerdo convencional libre de PRRSv inoculado intratraquealmente con *H. parasuis* (cepa 29755) a dosis de  $10^5$  UFC. Cerdo n° 356 (experimento 2).

Figura 6. Pulmón. Pleuritis fibrinosa desarrollada por un cerdo convencional libre de PRRSv y *H. parasuis* inoculado intratraquealmente con la bacteria (cepa 29755) a dosis de  $10^7$  UFC. Cerdo n° 4 (experimento 3).

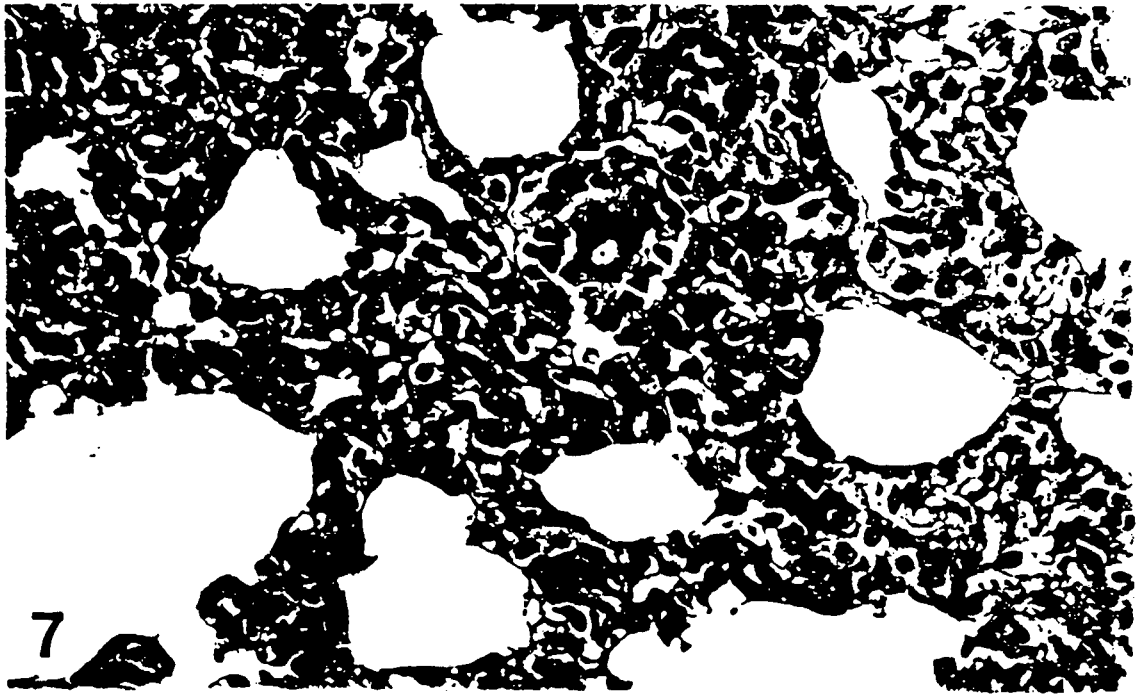


Figura 7. Pulmón. Neumonía intersticial. Aumento del grosor de los tabiques interalveolares debido a la presencia de células inflamatorias mononucleares. Cerdo n° 284, 13 días PI vírica y 7 PI bacteriana (experimento 1). Tinción de H/E. Aumento original: 100x.

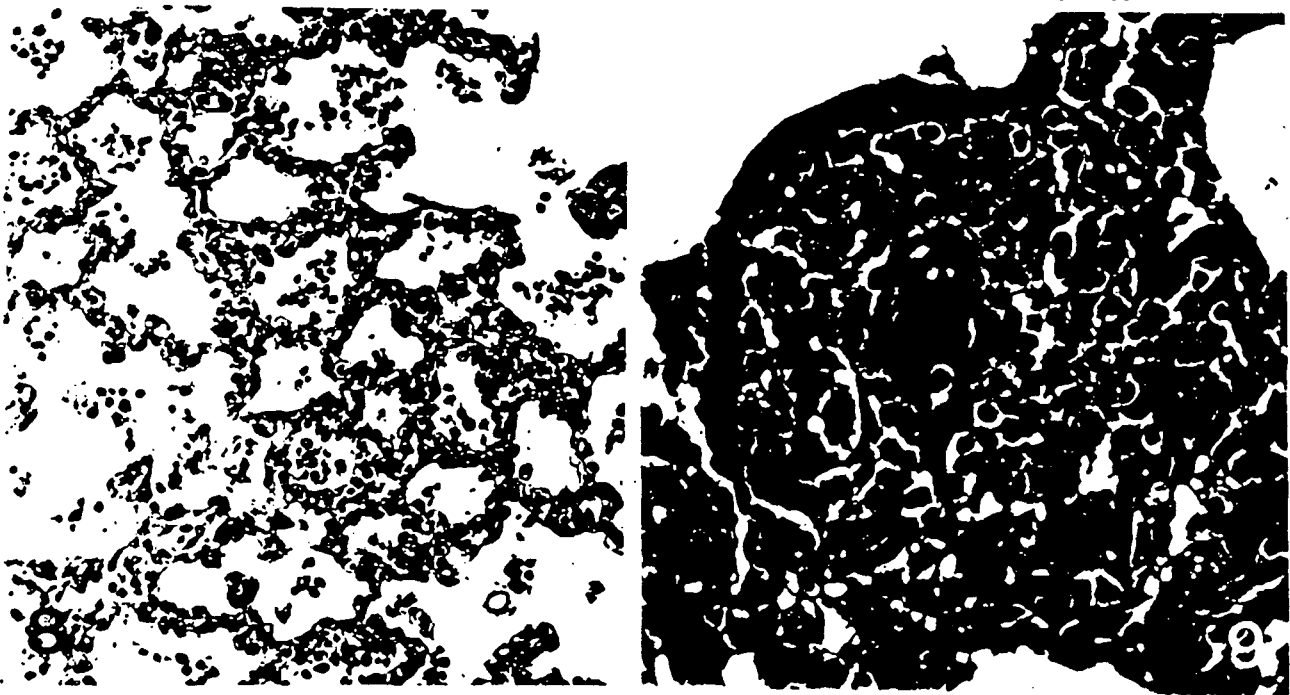
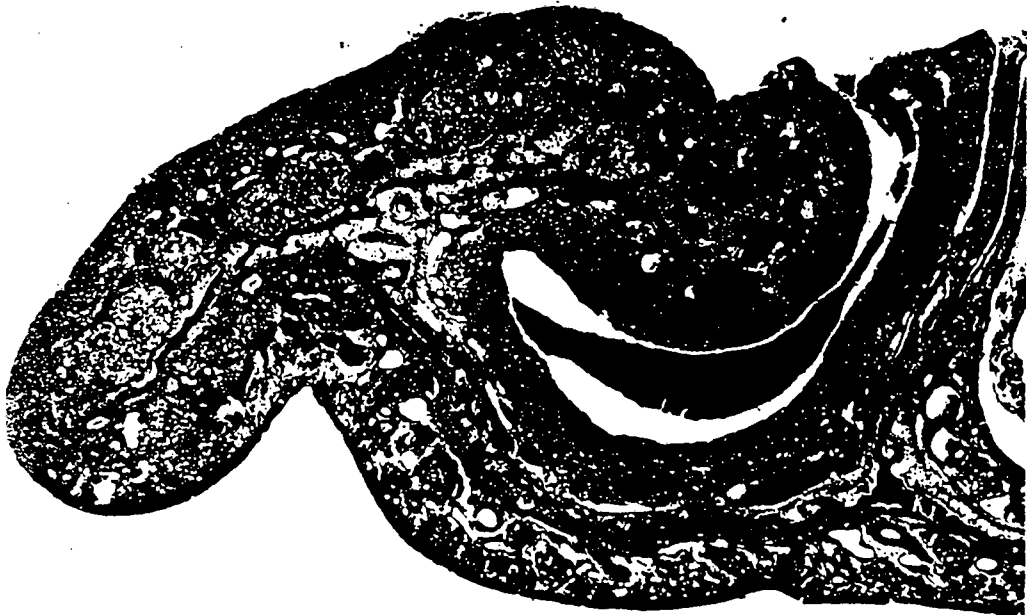


Figura 8. Pulmón. Neumonía intersticial. Presencia de células inflamatorias mononucleares en el interior del espacio alveolar. Los tabiques interalveolares se encuentran muy ligeramente aumentados de grosor. Cerdo n° 281, 11 días PI vírica y 5 PI bacteriana (experimento 1). Tinción de H/E. Aumento original: 50x.

Figura 9. Pulmón. Infiltrado inflamatorio mononuclear perivascular. Este proceso se desarrolló en todos los casos en los cuales se presentó neumonía intersticial. Cerdo n° 280, 13 días PI vírica y 7 PI bacteriana (experimento 1). Tinción de H/E. Aumento original: 100x.

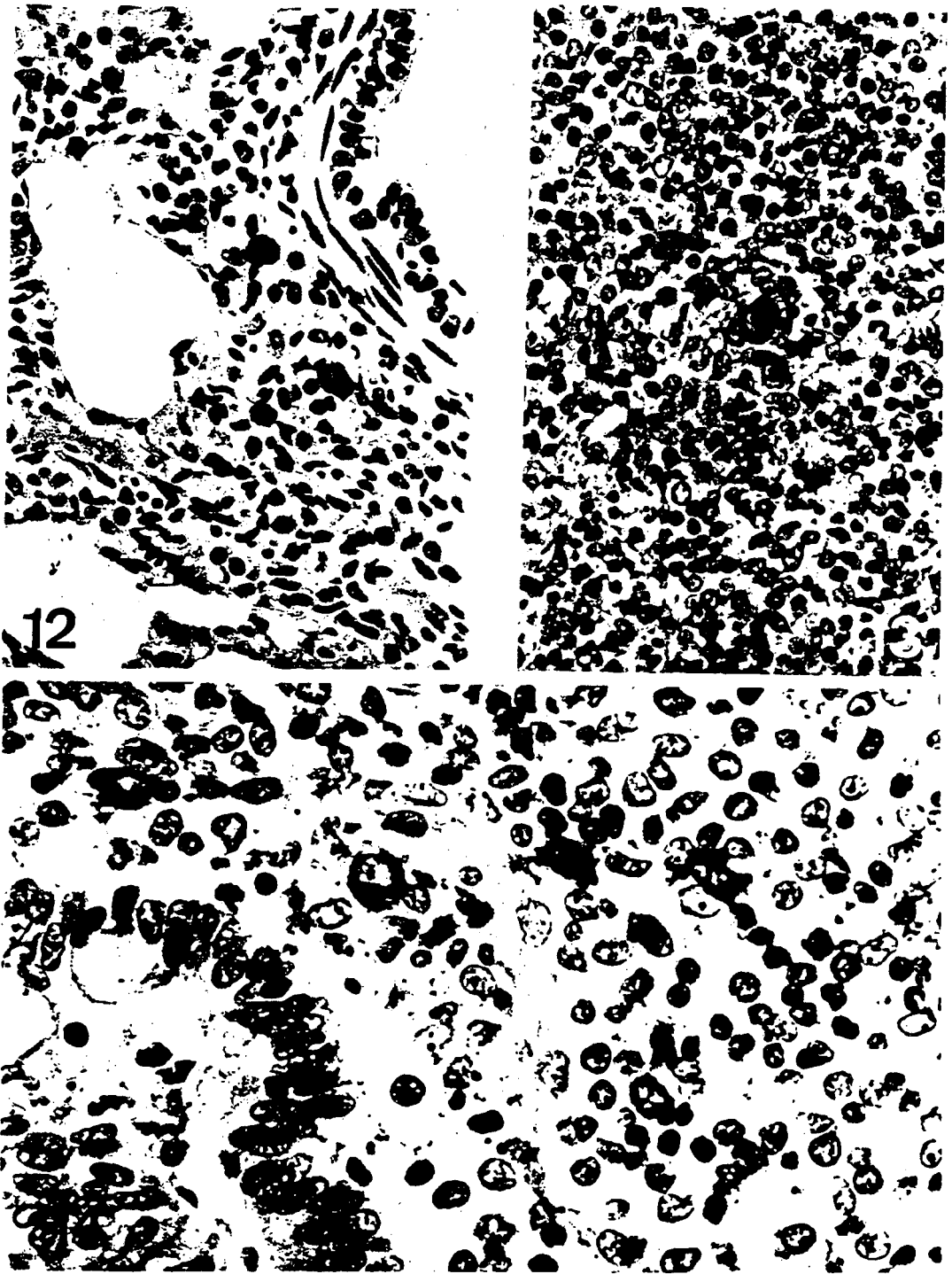




11

**Figura 10.** Pulmón. Bronconeumonía catarral-purulenta. Presencia de infiltrado inflamatorio básicamente polimorfonuclear en el interior de alveolos y bronquiolos. Cerdo nº 279, contacto con otros animales infectados con el PRRSv y 5 días PI bacteriana (experimento 1). Tinción de H/E. Aumento original: 25x.

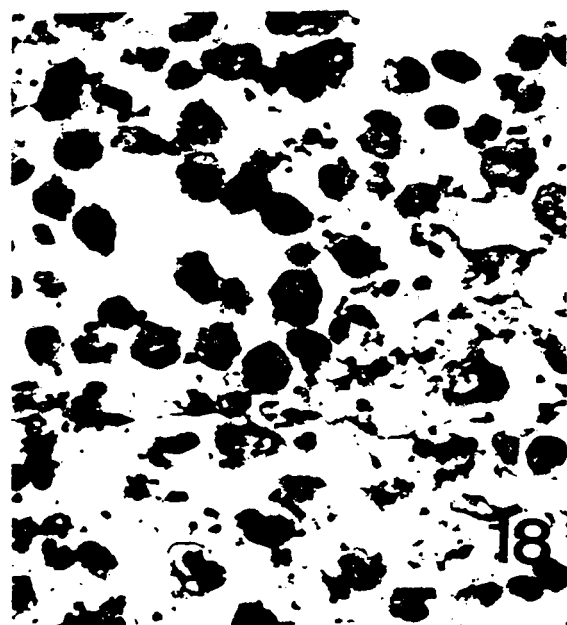
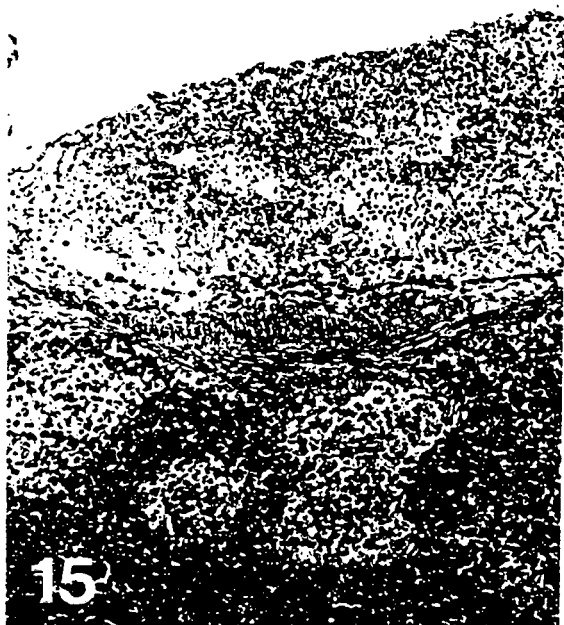
**Figura 11.** Mucosa nasal. Rinitis purulenta. Presencia de infiltrado inflamatorio polimorfonuclear en la superficie de la mucosa nasal. Cerdo nº 277, 9 días PI vírica y 3 PI bacteriana (experimento 1). Tinción de H/E. Aumento original: 5x.



**Figura 12.** Pulmón. Detección inmunocitoquímica del PRRSv en células de aspecto macrofágico en el intersticio pulmonar. Cerdo n° 281, 11 días PI vírica y 5 PI bacteriana (experimento 1). Tinción de hematoxilina. Aumento original: 100x.

**Figura 13.** Tonsila. Detección inmunocitoquímica del PRRSv en células de aspecto macrofágico y/o dendrítico en el parénquima de la tonsila. Cerdo n° 280, 13 días PI vírica y 7 días PI bacteriana (experimento 1). Tinción de hematoxilina. Aumento original: 100x.

**Figura 14.** Placa de Peyer. Detección inmunocitoquímica del PRRSv en células de aspecto macrofágico y/o dendrítico en una placa de Peyer. Cerdo n° 278, 9 días PI vírica y 3 días PI bacteriana (experimento 1). Tinción de hematoxilina. Aumento original: 160x.

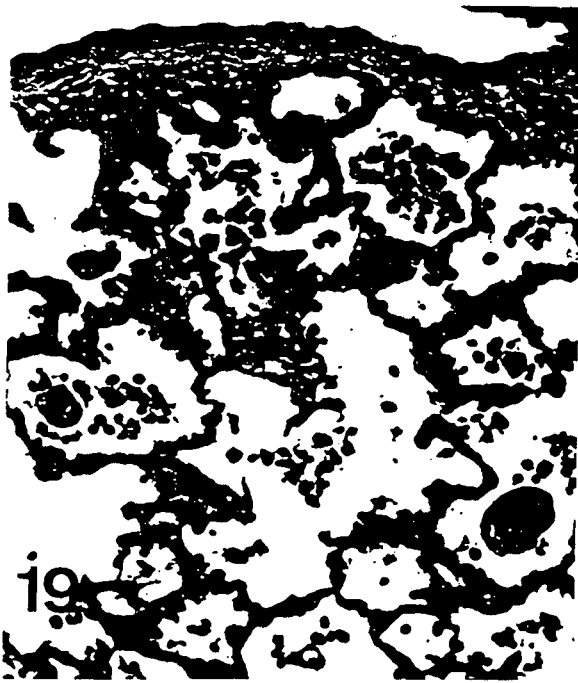


**Figura 15.** Bazo. Periesplenitis fibrinosa. Depósito de un infiltrado inflamatorio mixto con gran cantidad de fibrina en la superficie de la cápsula esplénica. Cerdo nº 356, 2 días PI bacteriana con la cepa 29755 (experimento 2). Tinción de H/E. Aumento original: 25x.

**Figura 16.** Hígado. Perihepatitis fibrinosa. Depósito de un infiltrado inflamatorio mixto con gran cantidad de fibrina en la superficie de la cápsula hepática. Cerdo nº 361, 4 días PI bacteriana con la cepa 42088 (experimento 2). Tinción de H/E. Aumento original: 25x.

**Figura 17.** Bazo. Detección inmunocitoquímica de *H. parasuis* en el interior de células inflamatorias y libre entre el exudado fibrino-purulento de la cápsula esplénica. Cerdo nº 356, 2 días PI bacteriana con la cepa 29755 (experimento 2). Tinción de hematoxilina. Aumento original: 25x.

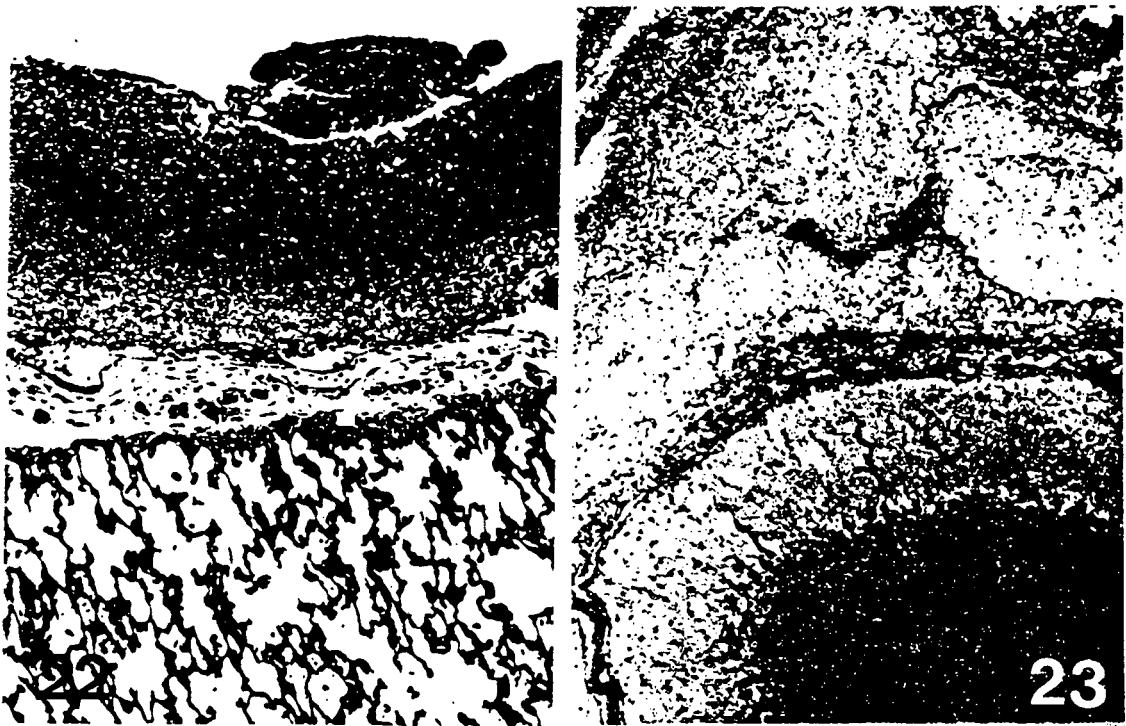
**Figura 18.** Hígado. Detección inmunocitoquímica de *H. parasuis* en el interior de células de aspecto macrófagico y libre entre el exudado fibrinoso correspondiente a la superficie de la cápsula hepática. Cerdo nº 361, 4 días PI bacteriana con la cepa 42088 (experimento 2). Tinción de hematoxilina. Aumento original: 200x.



**Figura 19.** Pulmón. Neumonía intersticial. Presencia de células inflamatorias mononucleares en el interior del espacio alveolar. Los tabiques interalveolares se encuentran ligeramente aumentados de grosor. Presencia de células sincitiales. Cerdo n° 12, 10 días PI vírica (grupo C, experimento 3). Tinción de H/E. Aumento original: 50x.

**Figura 20.** Pulmón. Neumonía intersticial. Presencia de células inflamatorias mononucleares en el interior del espacio alveolar. Los tabiques interalveolares se encuentran aumentados de grosor. Cerdo n° 12, 10 días PI vírica (grupo C, experimento 3). Tinción de H/E. Aumento original: 100x.

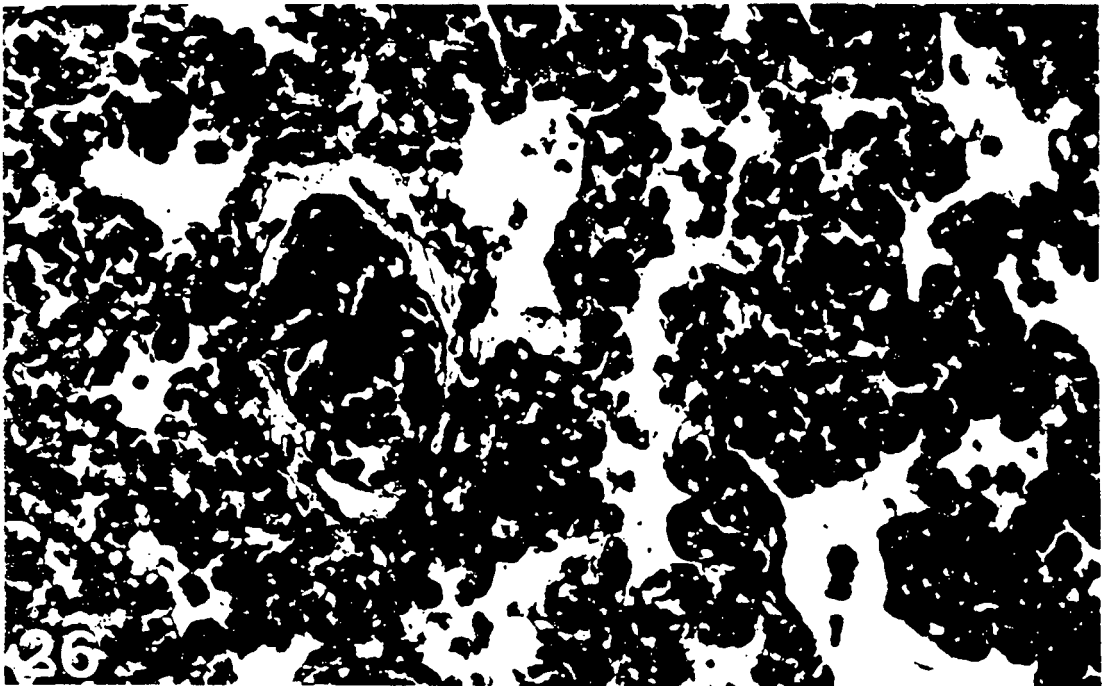
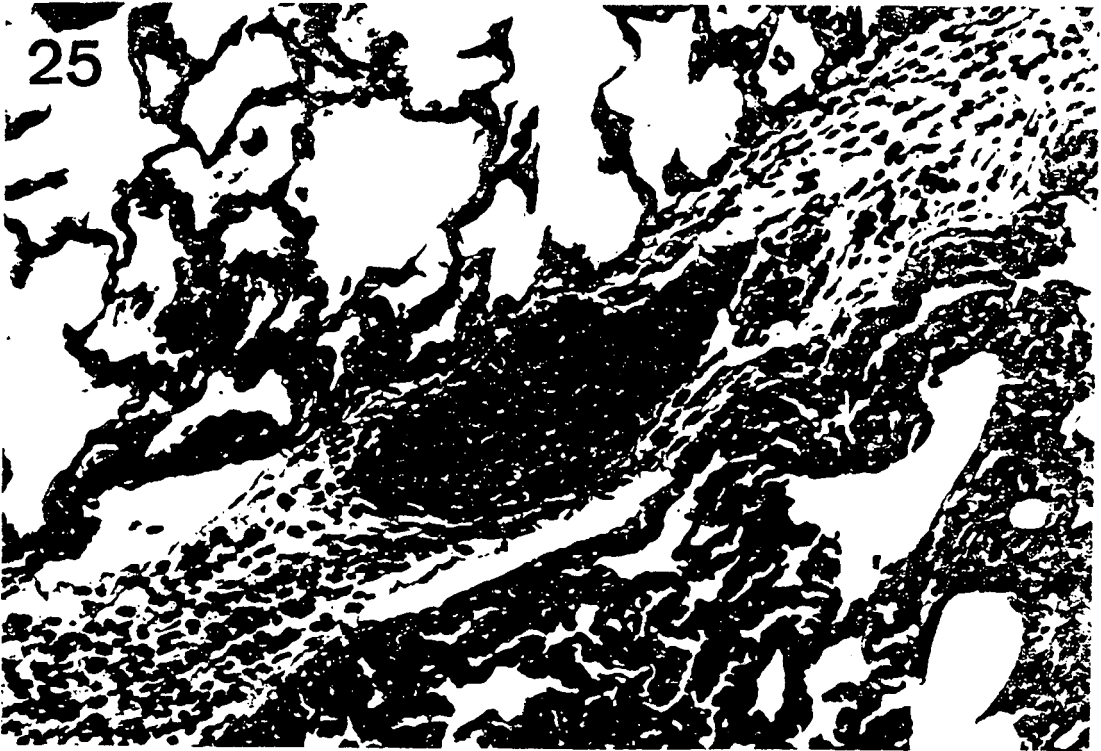
**Figura 21.** Ganglio linfático. Despoblación linfocitaria masiva en el ganglio linfático mediastínico. Cerdo n° 19, 9 días PI vírica y 4 PI bacteriana (grupo A, experimento 3). Tinción de H/E. Aumento original: 10x.



**Figura 22.** Pulmón. Pleuritis fibrinosa. Presencia de un intenso exudado fibrino-purulento en la serosa pleural. Cerdo nº 30, 3 días PI bacteriana (grupo B, experimento 3). Tinción de H/E. Aumento original: 25x.

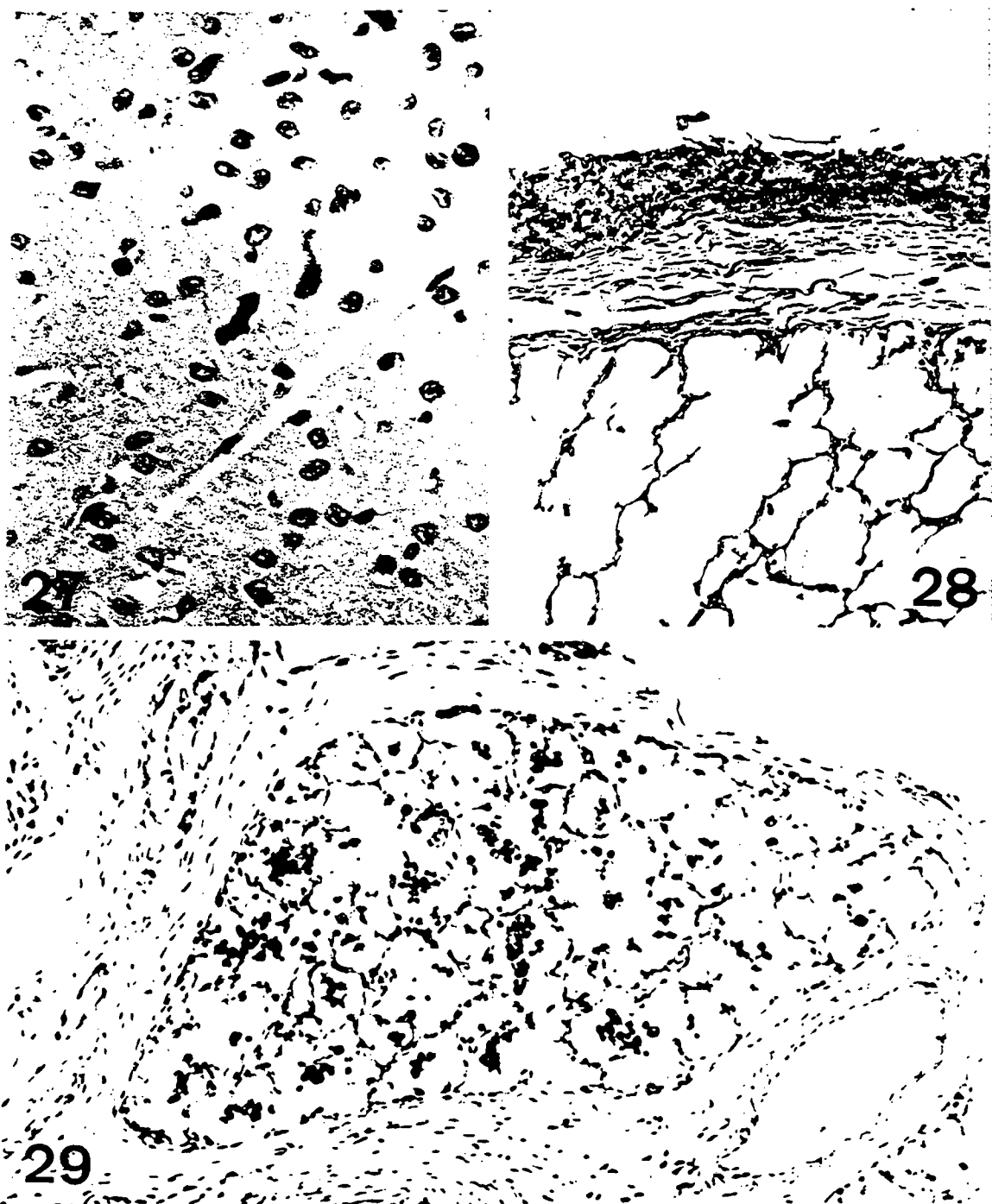
**Figura 23.** Encéfalo. Meningitis fibrinosa. Presencia de un muy intenso exudado fibrinoso en la superficie meníngea del cerebelo. Cerdo nº 29, 5 días PI bacteriana (grupo B, experimento 3). Tinción de H/E. Aumento original: 16x.

**Figura 24.** Encéfalo. Coroiditis fibrino-purulenta. Presencia de un exudado fibrino-purulento a nivel de vellosidades coroidales en el techo del IV ventrículo cerebral. Cerdo nº 29, 5 días PI bacteriana (grupo B, experimento 3). Tinción de H/E. Aumento original: 16x.



**Figura 25.** Pulmón. Edema intersticial e infiltración de los tabiques interlobulillares con un componente inflamatorio polimorfonuclear. Vaso linfático totalmente lleno de células inflamatorias polimorfonucleares. Cerdo nº 16, 2 días PI bacteriana (grupo B, experimento 3). Tinción de H/E. Aumento original: 50x.

**Figura 26.** Pulmón. Congestión masiva del parénquima pulmonar. Coagulación intravascular diseminada. Cerdo nº 9, 8 días PI vírica y 3 PI bacteriana (grupo A, experimento 3). Tinción de H/E. Aumento original: 100x.



**Figura 27.** Corazón. Detección inmunohistoquímica del PRRSv en células de aspecto macrofágico situadas entre las fibras del miocardio. Cerdo nº 31, 10 días PI vírica (grupo C, experimento 3). Tinción de hematoxilina. Aumento original: 160x.

**Figura 28.** Pulmón. Detección inmunohistoquímica de *H. parasuis* en el infiltrado inflamatorio fibrino-purulento de la serosa pleural. Cerdo nº 4, 5 días PI bacteriana (grupo B, experimento 3). Tinción de hematoxilina. Aumento original: 33x.

**Figura 29.** Pulmón. Detección inmunohistoquímica de *H. parasuis* en el interior de células macrofágicas del espacio alveolar. Cerdo nº 30, 3 días PI bacteriana (grupo B, experimento 3). Tinción de hematoxilina. Aumento original: 40x.

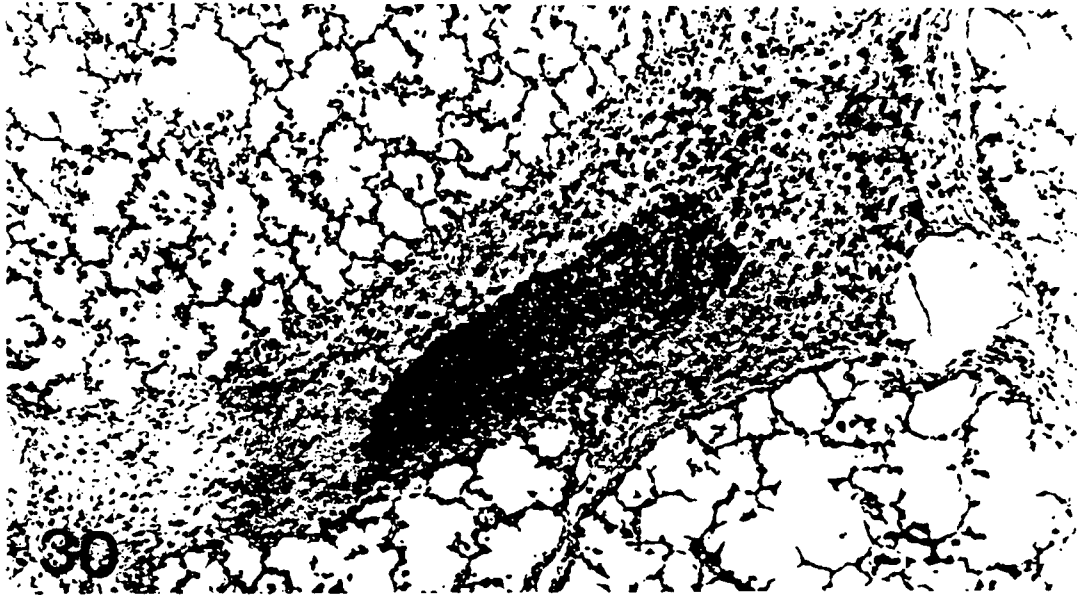
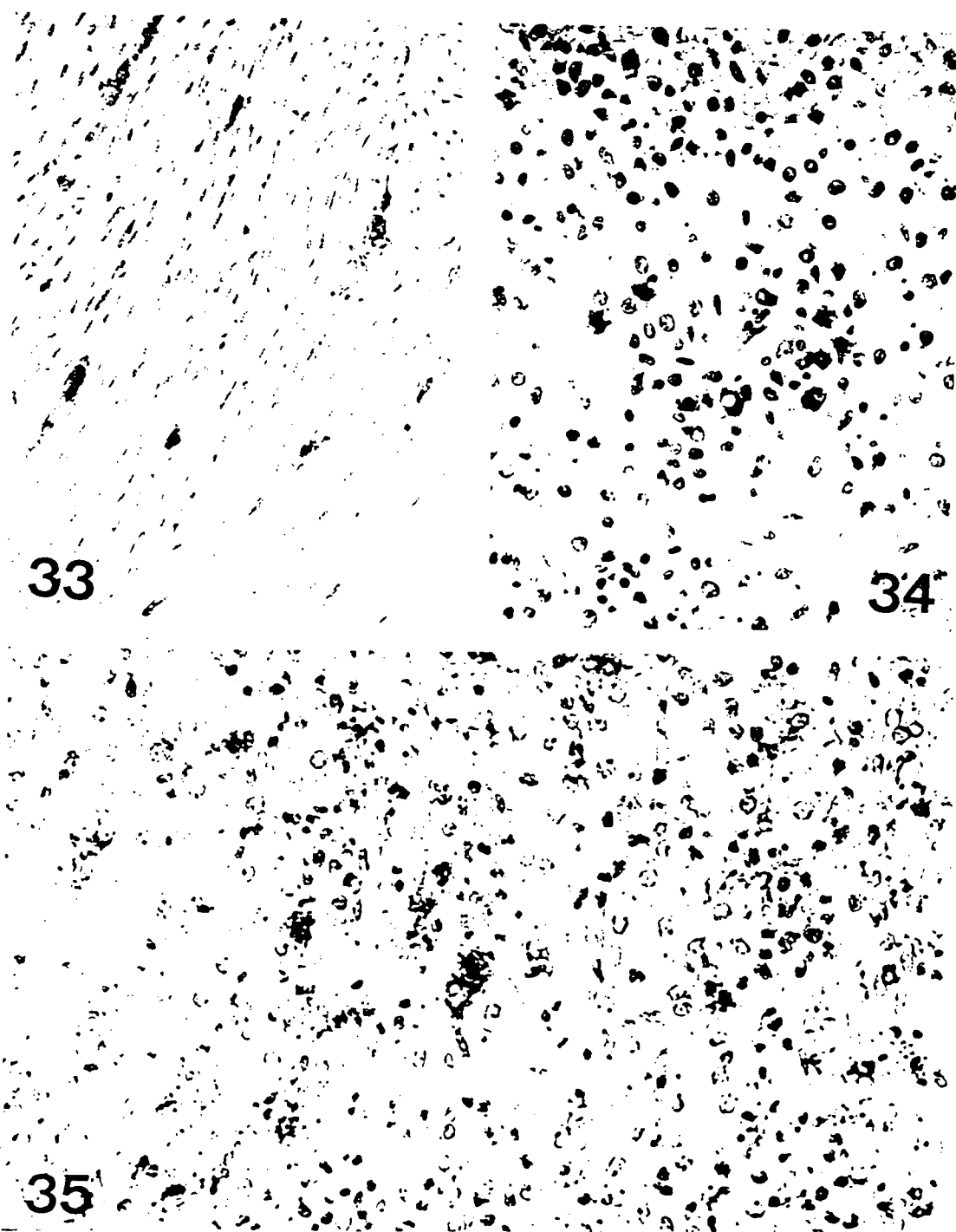


Figura 30. Pulmón. Detección inmunocitoquímica de *H. parasuis* en el exudado inflamatorio interlobulillar y en el interior de células inflamatorias contenidas en un vaso linfático distendido. Cerdo nº 16, 2 días PI bacteriana (grupo B, experimento 3). Tinción de hematoxilina. Aumento original: 20x.

Figura 31. Encéfalo. Detección inmunohistoquímica de *H. parasuis* en el exudado inflamatorio fibrino-purulento de la serosa meníngea del cerebro. Cerdo nº 21, 3 días PI bacteriana (grupo B, experimento 3). Tinción de hematoxilina. Aumento original: 50x.

Figura 32. Encéfalo. Detección inmunohistoquímica de *H. parasuis* en el exudado inflamatorio fibrino-purulento de la serosa meníngea del cerebelo. Cerdo nº 21, 3 días PI bacteriana (grupo B, experimento 3). Tinción de hematoxilina. Aumento original: 10x.





**Figura 33.** Corazón. Detección inmunohistoquímica de *H. parasuis* en células presentes en células del interior de los vasos sanguíneos del miocardio. Cerdo nº 21, 3 días PI bacteriana (grupo B, experimento 3). Tinción de hematoxilina. Aumento original: 50x.

**Figura 34.** Bazo. Detección inmunohistoquímica de *H. parasuis* en células de aspecto macrófago en la pulpa blanca del bazo. Cerdo nº 9, 8 días PI vírica y 3 días PI bacteriana (grupo A, experimento 3). Tinción de hematoxilina. Aumento original: 100x.

**Figura 35.** Riñón. Detección inmunohistoquímica de *H. parasuis* en células del intersticio y de túbulos renales. Cerdo nº 21, 3 días PI bacteriana (grupo B, experimento 3). Tinción de hematoxilina. Aumento original: 100x.

#### 4.4 DISCUSIÓN

Estos estudios representan la primera tentativa de demostrar experimentalmente una posible interacción entre el PRRSv y *H. parasuis*. El origen de estos estudios se basó en la sospecha de esta interacción en base a datos clínicos y según datos de laboratorios de diagnóstico, en cuya casuística de los últimos 5 años, con una amplia extensión del PRRS en todas sus formas clínicas, hubo un significativo aumento de lesiones de poliserositis en las zonas geográficas donde el PRRS tuvo una destacada incidencia (Molitor, 1993; Pijoan et al., 1994; Done y Paton, 1995; Vahle et al., 1995).

El tercer experimento, realizado con cerdos procedentes de una granja libre de PRRSv y de *H. parasuis*, y con una dosis de inoculación bacteriana de  $10^7$  UFC/ml. a los 5 días PI vírica, muestra la existencia de un efecto del PRRSv sobre la subsiguiente infección con *H. parasuis*. Este efecto, observado en los animales del grupo A, resulta en menor severidad de síntomas clínicos y lesiones que en el grupo de inoculación exclusivamente bacteriana (grupo B), pero con mortalidad súbita de algunos de los animales. Los animales del grupo B tuvieron mayor prevalencia de poliserositis, con afección de las serosas pleural, pericárdica, sinovial, peritoneal y meníngea, mientras que los animales del grupo A solo presentaron afectación pleural y meníngea.

Los experimentos 1 y 2 fueron realizados con animales del mismo origen, procedentes de granjas libres de PRRSv pero no de *H. parasuis*, y solo se logró reproducir poliserositis en 2 de los 16 animales (12%) del experimento 2. Esto se encuentra en oposición a la elevada prevalencia encontrada en el grupo B del experimento 3 (afectación de 7 de 10 animales, 70%) con unas condiciones de diseño experimental muy similares. A pesar de que hay diferencias de vía de inoculación entre los experimentos (vía I.N., I.T., y I.P. en el experimento 1, vía I.N. y I.T. en el experimento 2 y sólo vía I.T. en el experimento 3) y de dosis inoculada ( $10^8$  UFC/ml. en el experimento 1,  $10^2$  y  $10^5$  UFC/ml. en el experimento 2, y  $10^7$  UFC/ml. en el experimento 3) la mayor diferencia entre ellos estriba en el origen de los animales. A tenor de los resultados, el hecho de disponer de unos animales libres de PRRSv pero especialmente libres de *H. parasuis* proporcionó la posibilidad de encontrar un modelo adecuado de reproducción de enfermedad de

Glässer en el cual, como mínimo, se pueda reproducir significativamente la enfermedad en el 50% de los animales inoculados..

La dosis mínima de inoculación para poder reproducir la enfermedad de Glässer no se encuentra estandarizada, y los distintos autores han utilizado dosis muy variables que, en la mayoría de los casos, se relaciona directamente con el origen de los animales. Las dosis utilizadas varían entre  $10^2$  hasta  $10^{10}$  UFC/ml., y el tipo de animal escogido para realizar este tipo de experimentos habitualmente ha sido el cerdo gnotobiótico; o el derivado de cesarea y privado de calostro en su defecto (Kobish et al., 1980; Pöhle et al., 1992; Kielstein et al., 1994; Vahle et al., 1994).

A estos efectos, y en las condiciones de estudio expuestas, el experimento 3 muestra que la inoculación previa con el PRRSv si tiene un efecto marcado sobre la infección bacteriana. Este efecto parece desglosarse en dos componentes: menor nivel lesional y mayor mortalidad súbita. Una posible explicación de la diferencia entre el grupo A (animales inoculados con virus y bacteria) y el grupo B (animales inoculados con bacteria) del experimento 3 en cuanto a las lesiones observadas, podría ser el reconocido efecto inmunomodulador del PRRSv. Algunos autores (Molitor et al., 1992; Ohlinger et al., 1992; Molitor, 1993) han mostrado que a los 7 días PI vírica se ha producido una marcada disminución en el porcentaje de capacidad funcional de liberación de anión superóxido por parte de los macrófagos alveolares, además de producirse una masiva destrucción de este tipo celular. No obstante, y paradójicamente, también se ha descrito un efecto de mejora en cuanto a respuesta humoral y celular sistémica en animales infectados con el PRRSv. Estos dos efectos del virus podrían ayudar a explicar los efectos observados en el experimento 3. La destrucción local y disminución de funcionalidad de PAM facilitaría la multiplicación bacteriana en el pulmón y una rápida diseminación al resto del organismo. Ello supone que en cuestion de relativamente poco tiempo se produciría una bacteriemia muy marcada por microorganismos gram-negativos (*H. parasuis*), y por tanto niveles muy elevados de sustancias tipo LPS. Todo ello podría ejercer un efecto de shock séptico muy rápido que acabaría con la vida de los animales afectados. La rapidez de este proceso coincide con el hecho de no haber hallado lesiones en los animales afectados de muerte súbita, con excepción de marcada congestión pulmonar, hemorragias pulmonares y C.I.D., cuadro perfectamente compatible con

shock séptico. El aislamiento sistémico de la bacteria (datos no mostrados) y los resultados inmunocitoquímicos en estos animales apoyarían esta hipótesis.

Contrariamente, los animales que pudieran sobrevivir a esta fase tenderían a desarrollar menos lesiones generalizadas producidas por la bacteria debido a que a nivel sistémico existe una respuesta humoral y celular incrementada por efecto del virus. A pesar de ello, la bacteriemia si se produciría, tal como muestra el aislamiento sistémico de *H. parasuis* en estos animales (datos no mostrados) y los resultados inmunocitoquímicos.

El PRRSV no causó una elevación muy marcada de la temperatura rectal de los animales inoculados de los experimentos 1 y 3. Estos hallazgos se encuentran en consonancia con los de otros autores, los cuales relacionan la infección del PRRSV con una ligera hipertermia entre los días 2 y 4 PI (Collins et al., 1992; Rossow et al., 1994; Halbur et al., 1995b, 1996).

La inoculación de *H. parasuis* también causó hipertermia que osciló entre 40.3 y 41°C según grupo. No obstante, el aumento de temperatura rectal individual relacionado con la inoculación de la bacteria fue mucho más variado que en el caso del virus. Ello podría ser debido a que la infección con *H. parasuis* no fue homogénea en todo el grupo de animales inoculados (especialmente claro en los experimentos 2 y 3) por lo que se desprende de los datos clínicos y patológicos (algunos animales desarrollaron claros síntomas y lesiones de enfermedad de Glässer y otros no), y ello supone una disminución de la temperatura rectal final para el grupo. Este aumento de temperatura rectal PI bacteriana ha sido descrito previamente por otros autores (Neil et al., 1969; McDaniels y Cairns, 1990; Nicolet, 1992). No obstante, de forma individual, algunos de los animales que enfermaron de Glässer tuvieron hipertermia hasta 42.5°C y, en fase agónica, hipotermia de hasta 37°C. Quizá sea la variabilidad individual lo que causó que en el grupo B del experimento 2 tenga una disminución de temperatura rectal media del grupo que se sitúe a 39°C en el día 1 PI. De todas maneras, ésta es una temperatura que se encontraría en animales sanos.

Tanto los animales del experimento 2 como los del grupo B del experimento 3 que enfermaron de Glässer desarrollaron síntomas clínicos de depresión y postración, pero en ningún caso se observó muerte del animal no precedida de síntomas clínicos previos. Aunque la mortalidad fuera un

efecto observado solamente en el grupo A del experimento 3, es de reseñar también que estadísticamente este hecho no fue significativo respecto el grupo B, probablemente debido a un tamaño de muestra excesivamente pequeño. De todas maneras, hay que tener en cuenta que en el grupo B no murió ningún animal, entre otras cosas porque aquellos que mostraban un estado crítico eran sacrificados. No obstante, serían animales que, a nivel de campo, podrían al menos ser medicados ya que clínicamente mostraron síntomas, mientras que los animales que murieron del grupo A fue de forma totalmente inesperada y sin síntomas previos.

Dos de los cerdos del experimento 2, 1 del grupo A y 7 del grupo B del experimento 3 mostraron las típicas lesiones de poliserositis fibrino-purulenta asociadas a la enfermedad de Glässer. La intensidad, extensión y localización de estas lesiones se encuentran totalmente de acuerdo con las señaladas por otros autores previamente (Neil et al, 1969; Riley et al., 1977; Nicolet et al, 1992).

Solo en el caso de la afección meníngea no se encontró diferencia significativa entre los animales de los grupos A y B del experimento 3. La razón por la cual no hubo diferencias entre afección de meninges pero si en cuanto al resto de serosas entre los dos grupos es desconocido. Algunos autores han señalado que en ciertos brotes de enfermedad de Glässer la lesión meníngea puede llegar a estar presente en el 80% de los animales afectados, y en muchos casos ser la única serosa afectada (Palmer, 1992; Pöhle et al., 1992). La variabilidad en virulencia existente entre serovares podría explicar parcialmente este hecho, pero ello no explicaría la diferencia observada en el experimento 3.

Las lesiones atribuidas al PRRSv, especialmente la neumonía intersticial, estuvieron presentes en casi todos los animales inoculados con el virus. No obstante, las lesiones observadas en los pulmones en el momento de sacrificio (rango que osciló entre los 9 y 13 días PI vírica en el experimento 1 y 7 y 10 días PI en el experimento 3) fueron relativamente moderadas, y en los animales del grupo A del experimento 3, especialmente leves, en comparación a otras infecciones experimentales que utilizan unas dosis de infección muy parecidas (Pol et al., 1991; Collins et al., 1992; Halbur et al., 1993, 1995b, 1996; Rossow et al., 1994, 1995a). La mayoría de autores que muestran lesiones pulmonares significativas asociadas a PRRSv han utilizado animales gnotobióticos o, en su defecto, cerdos derivados de cesarea y privados de calostro (Pol et al., 1991;

Collins et al., 1992; Rossow et al., 1995a; Halbur et al., 1995b, 1996), probablemente mucho más sensibles a la infección por el PRRSv y al desarrollo de lesiones provocadas por el virus. En la literatura se ha descrito un elevado margen de variabilidad lesional causada por el PRRSv, y entre los factores relacionados con ello cabe destacar el origen de los animales, edad de los animales, dosis de inóculo vírico y número de pases del virus en cultivo celular (Collins et al., 1992; Van Reeth et al., 1995; Halbur et al., 1995b, 1996). A pesar de ello, una explicación definitiva que explique un moderado efecto del PRRSv sobre estos animales, es desconocida. Por otro lado, la mayoría de los cerdos infectados en estos experimentos fueron sacrificados entre los 7 y 12 días PI vírica. Quizá no sea éste un tiempo suficientemente prolongado como para poder observar un efecto patógeno muy marcado en animales convencionales de alta sanidad como los utilizados aquí, y especialmente para poder encontrar lesiones como miocarditis, encefalitis y otras alteraciones que aparecen más tardíamente en el transcurso de la enfermedad.

Los cerdos nº 16 y 30 presentaron adicionalmente una marcada distensión de los vasos linfáticos pleurales y del tabique interlobulillar, presentando un contenido inflamatorio formado casi exclusivamente por polimorfonucleares neutrófilos. Esta lesión podría ser debida a una extensión del proceso inflamatorio pleural o bien a partir de un proceso neumónico tipo bronco-neumonía catarral-purulenta. No obstante, solo el cerdo nº 30 presentó lesión neumónica y ambos presentaron una intensa pleuritis fibrino-purulenta. Ello sugeriría que la primera de las hipótesis es la más probable. La lesión observada, además, podría tener implicaciones fisiopatológicas importantes, dado que la presencia de pus y bacteria (demostrado por la técnica inmunocitoquímica) en vasos linfáticos pleurales, supone que este contenido linfático sería recogido en los ganglios linfáticos mediastínicos y traqueo-bronquiales y conducido a circulación general (vena Cava Craneal o vena Braquiocefálica) a través del conducto torácico. De esta manera se permitiría un mantenimiento más alargado de la bacteriemia y se facilitaría la posibilidad del shock séptico.

Las lesiones observadas en los animales que murieron súbitamente en el grupo A del experimento 3 fueron básicamente C.I.D. , hemorragia pulmonar y congestión masiva de todos los órganos. Lesiones muy similares fueron observadas en cerdos experimentalmente inoculados con suspensiones bacterianas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* a

dosis próximas a  $10^9$  UFC/cerdo con el objeto de reproducir un modelo de fallo respiratorio agudo en el cerdo (Dehring et al., 1982). En este trabajo no se observaron lesiones macroscópicas en los animales inoculados y solo se detectaron lesiones microscópicas consistentes en edema, congestión y hemorragia pulmonar. Además, se lograron aislar las bacterias de órganos internos como bazo, hígado y riñón, confirmando un proceso septicémico. Por otro lado, se produjeron muertes solo en los grupos donde fueron inoculadas bacterias gram-negativas (*P. aeruginosa* y *E. coli*) mientras que no se dieron en el grupo de animales inoculados con una bacteria gram-positiva (*Staphylococcus aureus*). En los 3 animales del grupo A del experimento 3 también se logró aislar *H. parasuis* de localización sistémica (datos no mostrados), y aún más evidente resulta con los datos de inmunocitoquímica para los animales n° 9 (antígeno circulante en miocardio, hígado y bazo) y n° 28 (antígeno circulante en miocardio y bazo). La CID es un proceso patológico secundario a distintas enfermedades. Básicamente se relaciona con complicaciones obstétricas, infecciones, tumores y daño tisular masivo (Cotran et al., 1989). Dentro del grupo de las infecciones, la sepsis por bacterias gram-negativas es la causa más frecuente de CID. Por ello, a través de las lesiones observadas, microbiología (datos no mostrados) e inmunocitoquímica, se puede atribuir la muerte súbita de los 3 cerdos del grupo A del experimento 3 a un proceso de septicemia y consecuentemente un proceso de shock séptico.

Tradicionalmente, otra de las lesiones asociadas a la infección por *H. parasuis* es la de bronconeumonía catarral-purulenta (Riley et al., 1977; Nascimento y Fagundes, 1991; Pöhle et al., 1992). No obstante, también es sabido que esta bacteria es un habitante normal de la flora del tracto respiratorio anterior de los cerdos (Pijoan et al., 1983; Moller y Kilian, 1990; Kruger et al., 1993; Moller et al., 1993) y, en la mayoría de los casos, la ocurrencia de bronconeumonía por *H. parasuis* se considera como infección secundaria a otros agentes víricos y/o bacterianos (Narita et al., 1994; Vahle et al., 1995). En el experimento 3, 4 animales del grupo A y 5 del grupo B desarrollaron neumonías en distintos grados, detectándose inmunocitoquímicamente antígeno de *H. parasuis* en todas ellas. Por ello se sugiere que esta bacteria podría ser, esporádicamente, un agente etiológico primario relacionado con la producción de neumonía porcina. Este fenómeno ya ha sido caracterizado en caso de infección con *H. parasuis* con dosis de  $10^{10}$  UFC/ml. (Pöhle et al., 1992).

En los estudios inmunohistoquímicos se han aplicado 2 técnicas de avidina-biotina-peroxidasa para la detección de PRRSv y *H. parasuis*. Ambas técnicas han sido previamente recogidas en la bibliografía, especialmente la utilizada para detectar el PRRSv (Halbur et al., 1994; Halbur et al., 1995a). Podríamos considerar la técnica de detección de *H. parasuis* usada en estos estudios como la primera utilización de una técnica inmunocitoquímica para la detección de este antígeno bacteriano en los distintos órganos de cerdos infectados experimentalmente. Solo existe una cita bibliográfica previa en la cual se utiliza esta técnica con el objeto de demostrar antígeno bacteriano en pulmón de animales inoculados con virus de la enfermedad de Aujeszky y que, casualmente, se infectaron con *H. parasuis* (Narita et al., 1994).

La detección del PRRSv en los tejidos correspondientes a los animales del experimento 1 se realiza básicamente en pulmón (6/9 cerdos) y, en un solo caso, en tonsila. La detección de antígeno vírico se realiza en 2/3 animales por grupo sacrificado a los 9, 11 y 13 días PI vírica. Estos datos se encuentran de acuerdo con los resultados obtenidos por otros autores con una técnica de inmunocitoquímica con oro coloidal (similar sensibilidad a la técnica de avidina-biotina peroxidasa (Larochelle y Magar, 1995)) en los cuales se detecta antígeno entre 1 y 21 días PI (Rossow et al., 1995b). No obstante, y acorde con el grado lesional moderado de pulmón, la cantidad de células positivas a la técnica fue relativamente baja.

En el experimento 3, esta detección de antígeno aún fue menor a nivel pulmonar: 4 de 10 cerdos en el grupo A y 2 de 5 en el grupo C. No obstante, miocardio y tonsila se mostraron como buenas muestras para estos animales para la detección de antígeno. La detección de antígeno vírico en corazón y tonsila ha sido previamente descrita entre los 4 y 9 días PI en cerdos nacidos por cesarea y privados de calostro de 3 semanas de edad (Halbur et al., 1995a). De forma similar, en el experimento 3 se utilizaron animales de prácticamente la misma edad y correspondientes a 7-10 días PI vírica. La razón por la cual no se observa marcaje en corazón y prácticamente tampoco en tonsila en los animales del experimento 1 es desconocida, pero quizá se relacione con el hecho de ser animales de mayor edad (10 días mayores a los del experimento 3) y de origen distinto.

La detección de antígeno de *H. parasuis* solo se realizó en animales de los experimentos 2 y 3, y con una correspondencia de prácticamente el 100% entre positividad por la técnica



inmunocitoquímica y lesiones. En la mayoría de los casos de serositis fibrino-purulenta hubo detección de antígeno bacteriano. Además, *H. parasuis* fue detectado en células monocíticas circulantes de distintos órganos como miocardio, hígado y bazo, hecho que confirma el carácter septicémico que se reconoce en la enfermedad de Glässer.

También fue detectado antígeno bacteriano en el interior de células macrofágicas y otras células inflamatorias (polimorfonucleares neutrófilos) del pulmón en casos de bronconeumonía catarral-purulenta. Este hecho sugiere que *H. parasuis* podría ser una causa primaria de esta lesión. También fue detectado antígeno bacteriano en las lesiones correspondientes a los animales n° 16 y 30 del grupo B del experimento 3. En ambos casos se pudo detectar antígeno en el interior de los tabiques interlobulillares, e incluso en el interior de células polimorfonucleares de los vasos linfáticos. En estos animales, en cambio, no se detectó antígeno en el interior de alveolos o células inflamatorias del interior de alveolos, por lo que la hipótesis de que este infiltrado inflamatorio tiene su origen en la pleura se refuerza.

Los resultados inmunocitoquímicos de detección de *H. parasuis* se correlacionaron cerca del 100% con los resultados de aislamiento microbiológico (datos no mostrados). De hecho, las muestras de tejido cerebral y pulmonar revelaron mayor sensibilidad que las muestras de líquido cefalorraquídeo y pulmón utilizadas para el aislamiento microbiológico. Por contra, no hubo diferencias en cuanto a muestras de peritoneo, y el líquido pericárdico resultó ser mejor muestra para el aislamiento microbiológico que el pericardio para inmunocitoquímica.

En conclusión, la técnica inmunocitoquímica para la detección de antígeno de *H. parasuis* tiene una buena correlación con el aislamiento bacteriano, y se puede considerar como un sistema de diagnóstico muy útil para la enfermedad de Glässer. Especialmente porque *H. parasuis* es un microorganismo de aislamiento relativamente difícil debido a sus necesidades de cultivo (Little, 1970; Morozumi y Nicolet, 1986; Morikoshi et al., 1990). Además, esta técnica permitiría la realización de estudios de patogenia y retrospectivos. No obstante, en este estudio se ha utilizado un antisero primario policlonal anti-serovar 5 (serovar homólogo al de la inoculación), y la técnica podría no ser efectiva en caso de infecciones con otros serovares. Esta sospecha se basa en

que, al menos a nivel vacunal, la protección cruzada entre serovares es limitada (Kocur et al., 1994; White et al., 1995).

En los experimentos 1 y 3 se demuestra que la infección vírica fue reproducida en todos los animales en los cuales se inoculó el PRRSv, con la excepción del animal n° 31 del grupo C del experimento 3. Para todo el resto de los animales se confirma que se trata de un hecho común la observación de efecto citopático a partir de muestras de suero entre 5 y 7 días PI vírica y una seroconversión entre los 7 y 12 días PI vírica, tal como se ha descrito previamente (Wensvoort et al. 1991; Yoon et al. 1992b; Mengeling et al. 1995).

#### **4.4.1 Resumen**

En resumen, en las condiciones experimentales de este trabajo, la infección de cerdos libres de PRRSv y *H. parasuis*, con el citado virus y seguido con la infección intratraqueal 5 días después con *H. parasuis* serovar 5, no resulta en un incremento de enfermedad de Glässer en comparación a aquellos animales inoculados única y exclusivamente con la bacteria, pero si en un incremento de la mortalidad. Estos hallazgos contrastan con las observaciones de campo, donde a la infección enzoótica con PRRSv se le atribuye un incremento en la incidencia de poliserositis debida a *H. parasuis*.

Además, la inoculación de *H. parasuis* serovar 5 en cerdos convencionales libres de PRRSv inoculados intranasal o intratraquealmente con una dosis entre  $10^2$  y  $10^8$  UFC/ml. no permite su uso como modelo de reproducción de poliserositis fibrinosa (enfermedad de Glässer).

Las hipótesis que podrían explicar la relación que parece haber entre el aumento del PRRSv, especialmente entre los años 1991 y 1993 (Meredith, 1994), y el aumento de poliserositis, son diversas. Entre ellas cabría destacar:

\* que la poliserositis observada no fuera debida a *H. parasuis* específicamente, sino que existieran otros microorganismos como *Mycoplasma hyorrhinis*, *Escherichia coli* u otros que actuaron en asociación con el PRRSv.

\* que el comercio continuo de animales, especialmente de países como Holanda y Alemania, hubiera introducido en nuestro país nuevos serovares de *H. parasuis* contra los cuales no existía una protección adecuada y resultara en la aparición casi epizootica de enfermedad de Glässer, coincidiendo casualmente con la entrada del PRRSv en España. Este fenómeno sería explicable dado que no existe protección cruzada para todos los serovares de *H. parasuis* (Kocur et al., 1994; Rapp-Gabrielson et al., 1994; White et al., 1995).

\* el diseño experimental planteado en estos estudios no satisface las condiciones que se presentan a nivel de campo; quizá otro protocolo con distintos momentos de desafío bacteriano y vírico permitirían mostrar asociación entre ambos agentes tal y como se sospecha por los datos clínicos y de diagnóstico laboratorial.

#### 4.4.2 Adendum

Con posterioridad a la realización de estos experimentos (el experimento 3, último en orden cronológico, finalizó en Septiembre de 1994), fue publicado en el Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 7 (3), 313-320, 1995, el trabajo "Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome: NEB-1 PRRSV infection did not potentiate bacterial pathogens" realizado por los autores V.L. Cooper, A.R. Doster, R.A. Hesse y N.B. Harris, de la Universidad de Nebraska. En este trabajo se estudian grupos de infección doble con el aislamiento NEB-1 del PRRSv y otras bacterias (*Salmonella cholerae-suis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis* y *Haemophilus parasuis*) con el objeto de demostrar la posible interacción entre el virus y las bacterias. En el caso de *H. parasuis* existen unas diferencias substanciales en cuanto al diseño experimental respecto a nuestro trabajo (dosis, vía de inoculación, número de animales por grupo y edad de ellos), pero la conclusión final supuso una no diferencia clara entre los grupos con solo bacteria y los grupos con

virus y bacteria. De esta manera, al igual que nosotros, no pudieron demostrar la posible interacción entre estos dos microorganismos tal como se sospecha en condiciones de campo.

#### 4.5 BIBLIOGRAFÍA

BAUTISTA, E.M.; GOYAL, S.M.; YOON, I.J.; JOO, H.S.; COLLINS, J.E.

Comparison of porcine alveolar macrophages and CL 2621 for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus and anti-PRRS antibody.

J. Vet. Diagn. Invest., 5(2): 163-165, 1993.

BENFIELD, D.A.; COLLINS, J.E.; JENNY, A.L.; LOULA, T.J.

Porcine reproductive and respiratory syndrome.

En: Diseases of swine 7th Edition, Ed. Leman, A.D.; Straw, B.E.; Mengeling, W.L.; D'Allaire, S.; Taylor, D.J., 756-762, 1992a.

COLLINS, J.E.; BENFIELD, D.A.; CHRISTIANSON, W.T.; HARRIS, L.; CHRISTOPHER-HENNINGS, J.; SHAW, D.P.; GOYAL, S.M.; MCCULLOUGH, S.; MORRISON, R.B.; JOO, H.S.; GORCYCA, D.; CHLADEK, D.

Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR 2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs.

J. Vet. Diagn. Invest., 4(2): 117-126, 1992.

COLLINS, J.E.; ROSSOW, K.D.

Pathogenesis of PRRS.

Proc. Allen D. Leman Swine Conf., 47-48, 1993.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L.

Disease of red blood cells and bleeding disorders. En: Pathologic basis of disease. Cotran, Kumar & Robbins Eds., 4<sup>a</sup> Edición, capítulo 14, 657-702, 1989.

DEHRING, D.J.; CROCKER, M.D.; WISMAR, B.L.; STEINBERG, S.M.; LOWERY, B.D.; CLOUTIER, C.T.

Comparison of live bacteria infusions in a porcine model of acute respiratory failure.

J. Surg. Res., 34: 151-158, 1983.

DONE, S.H.; PATON, D.J.

Porcine reproductive and respiratory syndrome: clinical disease, pathology and immunosuppression.

Vet. Rec., 136: 32-35, 1995.

HALBUR, P.G.; PAUL, P.S.; ANDREWS, J.J.; SANDERSON, T.P.; ROSS, R.F.; SCHWARTZ, K.J.; FREY, M.L.; ERICKSON, B.J.; HILL, H.T.; HOFFMAN, L.J.

Experimental transmission of an apparent viral pneumonia in conventional and gnotobiotic pigs.

Vet. Rec., 132: 263-266, 1993.

HALBUR, P.G.; ANDREWS, J.J.; HUFFMAN, E.L.; PAUL, P.S.; MENG, X.J.; NIYO, Y.

Development of a streptavidin-biotin immunoperoxidase procedure for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus antigen in porcine lung.

J. Vet. Diagn. Invest., 6: 254-257, 1994.

HALBUR, P.G.; MILLER, L.D.; PAUL, P.S.; MENG, X.J.; HUFFMAN, E.L.; ANDREWS, J.J.

Immunohistochemical identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antigen in the heart and lymphoid system of three-week-old colostrum-deprived pigs.

Vet. Pathol., 32: 200-204, 1995a.

HALBUR, P.G.; PAUL, P.S.; FREY, M.L.; LANDGRAF, J.; EERNISSE, K.; MENG, X.J.; LUM, M.A.; ANDREWS, J.J.; RATHJE, J.A.

Comparison of the pathogenicity of two US Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus isolates with that of the Lelystad virus.

Vet. Pathol., 32: 648-660, 1995b.

HALBUR, P.G.; PAUL, P.S.; MENG, X.J.; LUM, M.A.; ANDREWS, J.J.; RATHJE, J.A.

Comparative pathogenicity of nine US Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus (PRRSV) isolates in a five-week-old cesarean-derived, colostrum-deprived pig model.

J. Vet. Diagn. Invest., 8 (1): 11-20, 1996.

KIELSTEIN, P.; RABBACH, A.; PÖHLE, D.; JOHANNSEN, U.; WIEGAND, M.; SCHÄFER, M.

Zur Pathogenese der *Haemophilus parasuis* Infektion des Schweines (Glässersche Krankheit).

Mh. Vet. Med., 49: 71-75, 1994.

KIM, H.S.; KWANG, J.; YOON, I.J.; JOO, H.S.; FREY, M.L.

Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line.

Arch. Virol., 133: 477-483, 1993.

KIRK CLARK, L.; HILL, M.A.; KNIFFEN, T.S.; VAN ALSTINE, W.; STEVENSON, G.; MEYER, K.B.; WU, C.C.; SCHEIDT, A.B.; KNOX, K.; ALBREGTS, S.

An evaluation of the components of medicated early weaning.

Swine Health Prod., 2 (3): 5-11, 1994.

KOBISH, M.; DESMETTRE, P.; MAGUEUR, S.; MORVAN, P.; PAILLE, G.

Hemophilose du porc: pouvoir pathogène expérimental de deux souches d'*Haemophilus parasuis*.

Rec. Méd. Vét., 156 (3): 219-224, 1980.

KOCUR, G.J.; CLARK, J.T.; MUIR, S.K.; RAPP-GABRIELSON, V.J.

Protection and cross-protection of pigs vaccinated with different serovars of *Haemophilus parasuis*.

Proc. 75th Ann. Meet. CRWAD, 44, 1994.

KRÜGER, M.; PHU, C.H.; ZUCKER, B.; HORSCH, F.

Untersuchungen zur Besiedlung der Nasenschleimhaut von Ferkeln und Läufern mit den atemwegsrelevanten Bakterienspezies *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida* und *Haemophilus parasuis* in Beständen mit großer Tierkonzentration.

Mh. Vet. Med., 48: 418-424, 1993.

LAROCHELLE, R.; MAGAR, R.

Comparison of immunogold silver staining (IGSS) with two immunoperoxidase staining systems for the detection of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus (PRRSV) antigens in formalin-fixed tissues.

J. Vet. Diagn. Invest., 7: 540-543, 1995.

LITTLE, T.W.A.

*Haemophilus* infection in pigs.

Vet. Rec., 87: 399-402, 1970.

McDANIELS, T.; CAIRNS, R.

*Haemophilus parasuis* and its role in Swine disease.

Agri. Pract., 11 (7): 24-26, 1991.

MENGELING, W.L.; LAGER, K.M.; VORWALD, A.C.

Diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome.

J. Vet. Diagn. Invest., 7(1): 3-16, 1995.

MEREDITH, M.J.

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS)  
Fig Dis. and Info. Centre, Cambridge, August 1994.

MESSIER, S.; ROSS, R.F.; PAUL, P.S.

Humoral and cellular immune responses of pigs inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*.  
Am. J. Vet. Res., 51 (1): 52-58, 1990.

MOLITOR, T.W.; LEITNER, G.; CHOI, C.S.; RISDAHL, J.; ROSSOW, K.D.; COLLINS, J.E.

Modulation of host immune response by SIRS virus.  
Am. Assoc. Swine Pract. Newsl., 4: 27-28, 1992.

MOLITOR, T.W.

Immune responses to PRRS virus.  
Proc. Allen D. Leman Conf., 49-50, 1993.

MOLLER, K.; KILIAN, M.

V factor-dependent members of the family *Pasteurellaceae* in the porcine upper respiratory tract.  
J. Clin. Microbiol., 28 (12): 2711-2716, 1990.

MOLLER, K.; ANDERSEN, L.V.; CHRISTENSEN, G.; KILIAN, M.

Optimization of the detection of NAD dependent *Pasteurellaceae* from the respiratory tract of slaughterhouse pigs.  
Vet. Microbiol., 36: 261-271, 1993.

MORIKOSHI, T.; KOBAYASHI, K.; KAMINO, T.; OWAKI, S.; HAYASHI, S.; HIRANO, S.

Characterization of *Haemophilus parasuis* isolated in Japan.  
Jpn. J. Vet. Sci., 52 (3): 667-669, 1990.

MOROZUMI, T.; NICOLET, J.

Morphological variations of *Haemophilus parasuis* strains.  
J. Clin. Microbiol., 23 (1): 138-142, 1986a.

NARITA, M.; KAWASHIMA, K.; MATSUURA, S.; UCHIMURA, A.; MIURA, I.

Pneumonia in pigs infected with Pseudorabies Virus and *Haemophilus parasuis* serovar 4.  
J. Comp. Pathol., 110 (4): 329-339, 1994.

NASCIMENTO, J.; FAGUNDES, E.

Estudo da "Doença de Glasser" experimental em leitões oriundos de rebanho formado por desmama precoce medicada (DPM).  
Arq. Brasil. Med. Vet. Zoot., 44 (2): 158-160, 1991.

NEIL, D.H.; MCKAY, K.A.; L'ECUYER, C.; CORNER, A.H.

Glasser's disease of swine produced by the intratracheal inoculation of *Haemophilus suis*.  
Can. J. Comp. Med., 33: 188-193, 1969.

NELSON, E.A.; CHRISTOPHER-HENNINGS, J.; DREW, T.; WENSVOORT, G.; COLLINS, J.E.; BENFIELD, D.A.

Differentiation of U.S. and European isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by monoclonal antibodies.  
J. Clin. Microbiol., 31(12):3184-3189, 1993.

NICOLET, J.

*Haemophilus parasuis*.

En: Diseases of Swine, 7th Ed., Leman, Straw, Mengeling, D'Allaire y Taylor Ed., Iowa State University Press, 526-528, 1992.

OHLINGER, V.; HAAS, B.; SAALMULLER, A.; BEYER, J.; TEUFFERT, J.; VISSER, N.; WEILAND, F.  
In vivo and in vitro studies on the immunobiology of PRRS.  
Am. Assoc. Swine Pract. Newsl., 4: 24, 1992.

PALMER, N.  
Bones and joints.  
En: Pathology of domestic animals, 4th Edition, Jubb, Kennedy & Palmer Ed., Vol. 1: 101-108, 1991.

PIJOAN, C.; MORRISON, R.B.; HILLEY, H.D.  
Dilution technique for isolation of *Haemophilus* from swine lungs collected at slaughter.  
J. Clin. Microbiol., 18 (1): 143-145, 1983.

PIJOAN, C.; SOLANO, G.I.; SEGALES, J.  
PRRS virus and secondary disease.  
Proc. Allen D. Leman Conf., 225-226, 1994.

PÖHLE, D.; JOHANNSEN, U.; KIELSTEIN, P.; RABBACH, A.; WIEGAND, M.  
Investigations on pathology and pathogenesis of *Haemophilus parasuis* infection of swine.  
Proc. 12th. IPVS Congress, Holanda, 335, 1992.

POL, J.M.A.; VAN DIJK, J.E.; WENSVOORT, G.; TERPSTRA, C.  
Pathological, ultrastructural, and immunohistochemical changes caused by Lelystad virus in experimentally induced infections of mystery swine disease (synonym: porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS)).  
Vet. Q., 13: 137-143, 1991.

RAPP-GABRIELSON, V.J.; GABRIELSON, D.A.  
Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars among isolates from swine.  
Am. J. Vet. Res., 53 (5): 659-664, 1992.

RAPP-GABRIELSON, V.J.; KOCUR, G.J.; MUIR, S.K.; CLARK, J.T.  
Cross-protection following vaccination of swine with different serovars of *Haemophilus parasuis*.  
Proc. 13th IPVS Congress, Thailandia, 1994.

RILEY, M.G.I.; RUSSELL, E.G.; CALLINAN, R.B.  
*Haemophilus parasuis* infection in swine.  
J. Am. Vet. Med. Assoc., 171: 649-651, 1977.

ROSSOW, K.D.; BAUTISTA, E.M.; GOYAL, S.M.; MOLITOR, T.W.; MURTAUGH, M.P.; MORRISON, R.B.; BENFIELD, D.A.; COLLINS, J.E.  
Experimental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in one-, four-, and 10-week old pigs.  
J. Vet. Diagn. Invest., 6: 3-12, 1994.

ROSSOW, K.D.; COLLINS, J.E.; GOYAL, S.M.; NELSON, E.A.; CHRISTOPHER-HENNINGS, J.; BENFIELD, D.A.  
Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in gnotobiotic pigs.  
Vet. Pathol., 32: 363-371, 1995a.

ROSSOW, K.D.; COLLINS, J.E.; GOYAL, S.M.; NELSON, E.A.; CHRISTOPHER-HENNINGS, J.; BENFIELD, D.A.  
Chronological immunohistochemical detection and localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in gnotobiotic pigs.  
Proc. 38th Ann. Meet. AAVLD, 29, 1995b.

VAHLE, J.L.; ANDREWS, J.J.; HAYNES, J.S.  
Experimental reproduction of *Haemophilus parasuis* infection in swine: clinical, bacteriologic and morphologic findings.  
Proc. 37th Ann. Meet. AAVLD, 82, 1994.

VAHLE, J.L.; HAYNES, J.S.; ANDREWS, J.J.

Pathogenesis of *Haemophilus parasuis* infection: update of current research.

Proc. 26th Ann. Meet. AASP, 417-420, 1995.

VAN REETH, K.; PENSAERT, M.

Pathogenesis and clinical manifestations of PRRSV infection.

Proc. 2nd International Symp. on PRRS, 18, 1995.

WENSVOORT, G.; TERPSTRA, C.; POL, J.M.A.; TER LAAK, E.A.; BLOEMRAAD, M.; DE KLUYVER, E.P.; KRAGTEN, C.; VAN BUITEN, L.; DEN BESTEN, A.; WAGENAAR, F.; BROEKHUIJSEN, J.M.; MOONEN, P.L.J.M.; ZETSTRA, T.; DE BOER, E.A.; TIBBEN, H.J.; DE JONG, M.F.; VANT VELD, P.; GROENLAND, G.J.R.; VAN GENNEP, J.A.; VOETS, M.T.; VERHEIJDEN, J.H.M.; BRAAMSKAMP, J.

Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus.

Vet. Q., 13: 121-130, 1991.

WISEMAN, B.; GLOCK, R.D.; WILKINS, L.

Management of seedstock that is negative for *Haemophilus parasuis*.

Proc. 20th Ann. Meet. AASP, 23-25, 1989.

WHITE, R.D.; KOCUR, G.J.; CLARK, J.T.; MUIR, S.K.; RAPP-GABRIELSON, V.J.

Efficacy of *Haemophilus parasuis* bacterins against challenge with different *H. parasuis* serovars.

Proc. 26th Ann. Meet. AASP, 109-110, 1995.

YOON, I.J.; JOO, H.S.; CHRISTIANSON, W.T.; KIM, H.S.; COLLINS, J.E.; MORRISON, R.B.; DIAL, G.D.

An indirect fluorescent antibody test for the detection of antibody to swine infertility and respiratory virus in swine sera.

J. Vet. Diagn. Invest., 4(2): 144-147, 1992a.

YOON, I.J.; JOO, H.S.; CHRISTIANSON, W.T.; KIM, H.S.; COLLINS, J.E.; CARLSON, J.H.; DEE, S.A.

Isolation of a cytopathic virus from weak pigs on farms with a history of swine infertility and respiratory syndrome.

J. Vet. Diagn. Invest., 4(2): 139-143, 1992b.



**CAPÍTULO 5:**

**ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DE  
MACRÓFAGOS ALVEOLARES PORCINOS  
INFECTADOS *IN VITRO* CON PRRS<sub>v</sub>  
Y DUALMENTE CON PRRS<sub>v</sub> Y  
*Haemophilus parasuis***

## 5.1 INTRODUCCIÓN

El PRRSv es un virus relacionado físico-química y estructuralmente con los representantes de la familia *Togaviridae*: virus de la arteritis vírica equina (EAV), del género *Arterivirus*, y virus de la lactato-deshidrogenasa de los ratones (LDV) y fiebre hemorrágica de los simios (SHFV), incluidos en la familia pero sin clasificación de género (Fenner et al., 1987). Este hecho ha sugerido la reclasificación de todos estos virus en lo que sería la nueva familia *Arteriviridae* (Plagemann y Moenning, 1992; Meulenberg et al., 1993, 1994).

La célula diana primaria para todos estos virus es el macrófago. El LDV, SHFV y PRRSv tienen una replicación *in vitro* restringida a cultivos primarios de macrófagos y líneas celulares de riñón de mono (MA-104). El EAV, contrariamente, tiene capacidad de replicación en múltiples líneas celulares (Plagemann y Moenning, 1992; Meulenberg et al., 1994).

El LDV y el PRRSv presentan la capacidad de producir efectos inmunomoduladores *in vivo*. Estos efectos se caracterizan por causar efectos sistémicos consistentes en el aumento o disminución de respuestas frente a antígenos exógenos y actividad linfocitaria tipo T (Plagemann y Moenning, 1992; Molitor et al. 1992). Concretamente, el PRRSv causa destrucción de PAM (produce la destrucción del 40% o más de este tipo celular a los 7 días PI) y disminución de la funcionalidad de los PAM restantes por descenso de la producción de anión superóxido (Molitor et al. 1992; Molitor, 1993). Además, tanto LDV como PRRSv desarrollan el fenómeno de aumento de replicación dependiente de anticuerpo tanto *in vivo* como *in vitro* (Choi et al., 1992; Plagemann y Moenning, 1992; Christianson et al., 1993; Yoon et al., 1994).

La replicación del LDV es especialmente efectiva en cultivos de macrófagos procedentes de ratones de 1-2 semanas de edad, pero solo un máximo de 1-4% de estas células son infectadas productivamente (Plagemann y Moenning, 1992). Este hecho mantiene un marcado paralelismo con el PRRSv, donde de un cultivo de PAM procedentes de un cerdo joven (menos de 8 semanas) solo un 1-10% de las células resultan infectadas de forma productiva *in vitro*, incluyendo que además existe una susceptibilidad variable de los PAM a la replicación del PRRSv dependiendo del cerdo del cual se han extraído (Choi et al., 1995; Van Reeth, 1995). La reciente descripción de la existencia de subpoblaciones de PAM en el cerdo con diferencias de

susceptibilidad a la replicación del PRRSv en ellas podrían explicar este fenómeno. Paralelamente, se demostró que las subpoblaciones de PAM en las que la multiplicación vírica es más eficaz son también aquellas de mayor capacidad fagocítica (Choi et al., 1995).

En este último fenómeno se basarían algunas de las hipótesis sobre la patogenia de las interacciones sugeridas entre el PRRSv y otros agentes bacterianos y víricos. El virus provocaría una destrucción importante de PAM, los cuales serían substituidos por células inmaduras que no serían capaces de fagocitar y destruir a otros agentes, permitiendo su posterior paso al torrente circulatorio provocando septicemia o bien afectando directamente al pulmón provocando neumonía (Pijoan et al., 1994).

Uno de los agentes que con más asiduidad ha sido asociado clínicamente a la infección por PRRSv es *H. parasuis* como productor de brotes de poliserositis en granjas que previamente han sufrido brotes epizoóticos de PRRS (Molitor, 1993; Pijoan et al., 1994; Vahle et al., 1995). Los mecanismos de esta posible asociación se desconocen actualmente, pero basándose en que los PAM juegan un papel central en la defensa contra bacterias (fagocitosis y liberación de citoquinas tipo IL-1 $\beta$ , TNF y IFN (Kessinger et al., 1987)), se ha sugerido un papel importante de los PAM en la patogenia de las infecciones duales relacionadas con el PRRSv (Van Reeth, 1995).

El objetivo de este trabajo es estudiar posibles interacciones *in vitro* entre el PRRSv y *H. parasuis* en cultivos primarios de PAM y describir los cambios ultraestructurales de estas células infectadas con el virus y/o la bacteria, con especial interés en si los PAM infectados con PRRSv son capaces de fagocitar a *H. parasuis* y en que medida.

## 5.2 MATERIAL Y MÉTODOS

**Obtención de PAM:** Los PAM fueron obtenidos a partir de cerdos de 4-6 semanas de edad procedentes de una granja libre de PRRS y *H. parasuis*. Los animales fueron sacrificados por inyección intravenosa de 2 ml. de una solución de pentobarbital sódico. Traquea y pulmones fueron extraídos de la cavidad torácica, y se les practicó un lavado broncoalveolar. Para ello se introdujo

un volumen de 200 ml. de tampón fosfato salino (PBS) 0.1 M (pH = 7.2), y se realizó un masaje firme y constante de todos los lóbulos pulmonares de duración entre 1 y 2 minutos, y finalmente se recuperó el líquido de lavado por decantación en frascos estériles de plástico siliconizado y base cónica de 250 ml. de volumen. El líquido fue centrifugado durante 15 minutos a 1600 rpm y se descartó el sobrenadante. El sedimento celular fue resuspendido en 50 ml. de medio RPMI-1640 con antibióticos (penicilina/estreptomicina, neomicina y gentamicina) y antifúngicos (fungizona), y se realizó conteo y viabilidad celular utilizando un hematocitómetro (cámara de Neubauer) y la tinción de azul tripano. Finalmente, la concentración de células fue ajustada a  $2 \times 10^6$  PAM/ml. de medio.

**Inóculo vírico:** Se utilizó la cepa de referencia americana, VR-2332, con 5 pases de cultivo en la línea celular CL 2621. Se realizó una infección de 1 MOI (1 multiplicidad de infección), que correspondió a una partícula vírica procedente de una suspensión de  $10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml. por PAM presente en cultivo.

**Inóculo bacteriano:** Se utilizó la cepa 29755 de *H. parasuis*, de serovar 5. Se realizó una inoculación de 25 bacterias por PAM presente en cultivo, procedentes de una suspensión de  $10^9$  UFC/ml. La bacteria fue opsonizada durante 45 minutos a 37°C con suero hiperimmune de cerdo contra el serovar 5 de *H. parasuis* al 10%.

**Diseño experimental:** Se realizaron dos experimentos para determinar las características ultraestructurales de los PAM infectados *in vitro* con PRRSv (experimento 1), y para estudiar el efecto sobre estas características en el caso de infección doble con PRRSv y *H. parasuis* (experimento 2). En ambos experimentos, los PAM fueron incubados en rotación en una estufa a 37°C y con una atmósfera de 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) durante todo el período de estudio.

En el experimento 1 las muestras de PAM fueron recogidas a las 2 (muestra (M) 1), 14 (M2), 22 (M3), 34 (M4) y 48 (M5) horas PI e inmediatamente fijadas con una mezcla del 1.5% de glutaraldehído y 1.5% de para-formaldehído. Las tres primeras muestras (M1, M2 y M3), correspondientes a 2, 14 y 22 horas PI, fueron recogidas simultáneamente, dado que el protocolo de infección para estas muestras supuso infectar primero M3, 8 horas después M2 y 20 horas después M1, de manera que cumplieron el tiempo PI simultáneamente. Por ello solo se utilizó un