

control negativo para las tres muestras. Las muestras M4 y M5 fueron inoculadas a la vez que M3 pero no se recolectaron hasta 12 y 26 horas después. Para estas muestras se utilizó un control negativo individual. Los controles negativos fueron suspensiones de PAM en medio RPMI-1640 sin adición de virus.

En el experimento 2, a las 2 (muestra (N) 1), 14 (N2) y 22 (N3) horas PI vírica, los PAM fueron inoculados con *H. parasuis* a proporción PAM:bacteria de 1:25. Se recogieron muestras de células infectadas dualmente con el virus y la bacteria a los 0, 30 y 90 minutos PI bacteriana siendo inmediatamente después fijadas con una mezcla del 1.5% de glutaraldehido y 1.5% de paraformaldehido. La infección bacteriana se realizó simultáneamente en los tres grupos de infección vírica, dado que el protocolo de infección para estas muestras supuso infectar primero N3, 8 horas después N2 y 20 horas después N1, de manera que cumplieron el tiempo PI vírica simultáneamente. Se utilizó un control negativo válido para las tres muestras correspondiente a una suspensión de PAM en medio RPMI-1640 sin adición de virus. Como controles de inoculación vírica se utilizaron las mismas muestras N1, N2 y N3 pero sin la adición de bacteria. Como controles de inoculación bacteriana se utilizaron cultivos de PAM en medio RPMI-1640 con tiempos de incubación bacteriana de 0, 30 y 90 minutos. En la tabla 1 se presenta el diseño experimental para el experimento 2.

Tabla 1. Esquema del diseño del experimento 2 mostrando los tiempos de inoculación vírica y bacteriana de los cultivos de PAM.

Tratamiento		Minutos PI bacteriana		
----	----	----	----	----
----	<i>H. parasuis</i>	0	30	90
PRRS 2h	----	----	----	----
PRRS 2h	<i>H. parasuis</i>	0	30	90
PRRS 14h	----	----	----	----
PRRS 14h	<i>H. parasuis</i>	0	30	90
PRRS 22h	----	----	----	----
PRRS 22h	<i>H. parasuis</i>	0	30	90

Inmunofluorescencia indirecta (IFA) para la detección de PRRSv: Paralelamente, para cada muestra procesada, 2 horas antes de cumplirse el tiempo de incubación vírica deseado, se tomaron

200 μ l. de suspensión de PAM que se colocó en un pocillo de cristal con un cubreobjetos redondeado de 0.8 cm. de diámetro en el fondo. Se permitió la adherencia de los PAM durante 2 horas al cubreobjetos y posteriormente se realizó la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFA), previamente descrita en la literatura (Yoon et al., 1992).

Microscopía Electrónica de Transmisión: Posteriormente a la fijación, los PAM fueron lavados 2 veces con PBS 0.1 M durante 5 minutos cada vez y se realizó una post-fijación con tetróxido de osmio (OsO_4) al 1% en PBS 0.1 M durante 1 hora. A continuación se realizaron 2 lavados más de las células, se deshidrataron en una serie creciente de acetonas (25%, 50%, 70%, 95%, 100% y 100% con Alumina activada como agente deshidratante) y fueron embebidas en resina Epon-Araldita. Los cortes se realizaron a con un ultramicrotomo Ultracut E (Reichert-Jung). Las secciones semifinas fueron teñidas con azul de toluidina y las rejillas con cortes ultrafinos fueron contrastadas con acetato de uranilo y citrato de plomo. La observación de las muestras se realizó a través de un microscopio electrónico de transmisión JEM-1200 Ex II (Jeol).

Clasificación ultraestructural de los PAM: La morfología celular fue determinada por el conteo de 100 PAM por tratamiento, a un aumento de 15.000x. Los parámetros medidos, modificación de una clasificación descrita previamente (Fuentes, 1986), incluyen la presencia y número de lisosomas, presencia de fagosomas y presencia de fagolisomas.

Esta clasificación contiene 7 categorías distintas incluidas en 5 grupos:

Categoría A. Número de células en reposo; ultraestructuralmente poseen 5 o menos lisosomas por célula.

Categoría B. Número de células con un mayor número de lisosomas (X):

B1. Baja presencia de lisosomas ($5 < X < 10$)

B2. Mediana presencia de lisosomas ($10 < X < 20$)

B3. Elevada presencia de lisosomas (> 20)

Categoría C. Número de células con fagosomas.

Categoría D. Número de células con fagolisosomas.

Categoría E. Número de células degenerativas (definidas como células que han perdido su integridad ultraestructural).

Cada célula examinada fue asignada a una sola de las mencionadas categorías. Si una célula cumplía los requisitos de más de una categoría, ésta fue clasificada en la categoría que suponía un mayor estado de evolución celular (estado de activación más avanzado).

Paralelamente, los PAM fueron clasificados según su grado de vacuolización usando el baremo siguiente:

Categoría A. Células sin vacuolización aparente.

Categoría B. Células con menos de 5 vacuolas endocíticas y de tamaño inferior a 1 μm .

Categoría C. Células con más de 5 vacuolas endocíticas y de tamaño inferior a 1 μm .

Categoría D. Células con menos de 5 vacuolas endocíticas y de tamaño superior a 1 μm .

Categoría E. Células con más de 5 vacuolas endocíticas y de tamaño superior a 1 μm .

El término Porcentaje de Células Activadas (PCA) utilizado en este trabajo significa el número total de células menos el número de células en reposo (células de la categoría A) y número de células degenerativas (células de la Categoría E) (valor expresado en porcentaje).

Para el experimento 1 se definió el Porcentaje de Fagocitosis No específica (PFNE), calculado sumando el número de células de las categorías C (células con fagosomas) y D (células con fagolisosomas). En el caso del experimento 2 se definió un Porcentaje de Fagocitosis Específica (PFE), que expresó el porcentaje de PAM que presentaron internalizadas al menos una bacteria, independientemente del porcentaje final suma de fagosomas y fagolisosomas.

Análisis estadístico: Para determinar diferencias entre tratamientos se utilizó un modelo aditivo lineal para datos categóricos del análisis de la varianza. Se consideró una diferencia significativa entre tratamientos cuando $p < 0.05$.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Características ultraestructurales de PAM infectados *in vitro* con PRRSV.

Un 95% de las células presentes en el lavado broncoalveolar fueron identificadas como células macrofágicas en base a sus características morfológicas a través de la observación en microscopio óptico (extensiones directas de fluido broncoalveolar y cortes semifinos (Figura 1)). El resto de células fueron identificadas como linfocitos, polimorfonucleares neutrófilos y eritrocitos.

La viabilidad celular calculada a través de la tinción de azul tripano fue del 88-95% en todos los grupos, no hallándose diferencia significativa ($p > 0.05$) entre grupos inoculados con virus (M1, M2, M3, M4 y M5) ni entre éstos y los controles negativos.

La prueba de IFA demostró positividad específica en todos los tiempos PI vírica (Figura 2). El porcentaje de células positivas fue realmente muy bajo para todos ellos, siendo menor del 3% para las 2 horas PI y entre el 3-10% para el resto de tiempos.

Ultraestructuralmente, los PAM presentaron una forma predominantemente esférica, diámetro variable entre 8 y 15 μm y relación nucleo:citoplasma entre 1:3 y 1:5. El núcleo era habitualmente indentado, y el citoplasma contenía una cantidad variable según tratamiento de vacuolas endocíticas, lisosomas, fagosomas y fagolisosomas. No se apreció diferencia ultraestructural en mitocondrias, aparato de Golgi y retículo endoplasmático entre los distintos tratamientos. Respecto a los controles negativos, la presencia de virus provocó una disminución del número de pseudopodios (prolongaciones citoplasmáticas) de los PAM y un aumento especialmente de lisosomas a las 2 horas PI, que se mantiene hasta las 48 horas PI. El número de células que presentaron fagosomas y fagolisosomas aumentaron de forma continua entre las 2 y 48 horas PI (Tabla 1). La presencia de vacuolas endocíticas también se encontró aumentada tanto en tamaño como en número en los

grupos con inoculación vírica, y ésta tendía a aumentar con el tiempo de incubación (Tabla 2), no obstante la diferencia entre grupos no fue significativa ($p>0.05$).

Tabla 1. Cambios ultraestructurales de PAM infectados y no infectados con PRRSv.

CATEGORIA*	2, 14, 22 h.	2 h.	14 h.	22 h.	34 h.		48 h.	
	NEG.	VIR.	VIR.	VIR.	NEG.	VIR.	NEG.	VIR.
A	65	21	10	10	62	14	61	7
B1	13	18	15	11	14	17	10	8
B2	10	24	25	25	8	19	11	21
B3	2	14	23	21	4	12	4	17
C	5	15	17	20	6	20	5	16
D	5	4	8	10	6	17	8	23
E	0	4	3	3	0	1	1	8
TOTAL	100	100	100	100	100	100	100	100
PCA**	35%	75%	87%	87%	38%	85%	38%	85%

NEG. = control negativo para un tiempo/s PI vírico específico/s

VIR. = muestras con inoculación vírica

*A = PAM en reposo (<5 lisosomas/célula).

B = PAM con mayor número de lisosomas (B1, entre 5 y 10 lisosomas/célula; B2, entre 10 y 20 lisosomas/célula; B3, más de 20 lisosomas/célula).

C = PAM con presencia de fagosomas.

D = PAM con presencia de fagolisosomas.

E = PAM con pérdida de su integridad ultraestructural.

** Percentage de Células Activadas.

La clasificación ultraestructural reveló que el número de células en reposo fue significativamente mayor ($p<0.05$) en los controles negativos (rango entre 61 y 68%) que en los grupos inoculados con el virus (rango entre 7 y 21%). Los grupos con inoculación vírica no demostraron diferencias significativas entre ellos en términos de ultraestructura ($p>0.05$).

El porcentaje de fagocitosis no específica aumentó con el tiempo de incubación (Figura 1) y éste fue estadísticamente significativo ($p<0.05$) a las 14, 22, 34 y 48 horas. No hubo diferencia significativa entre control negativo y tratamiento con 2 horas de incubación vírica ($p>0.05$). El PCA (Tabla 1) fue diferente estadísticamente entre los grupos inoculados con el virus y los controles negativos ($p<0.05$).

Figura 3. Porcentaje de fagocitosis no específica de PAM infectados o no con PRRSv a las 2, 14, 22, 34 y 48 horas PI.

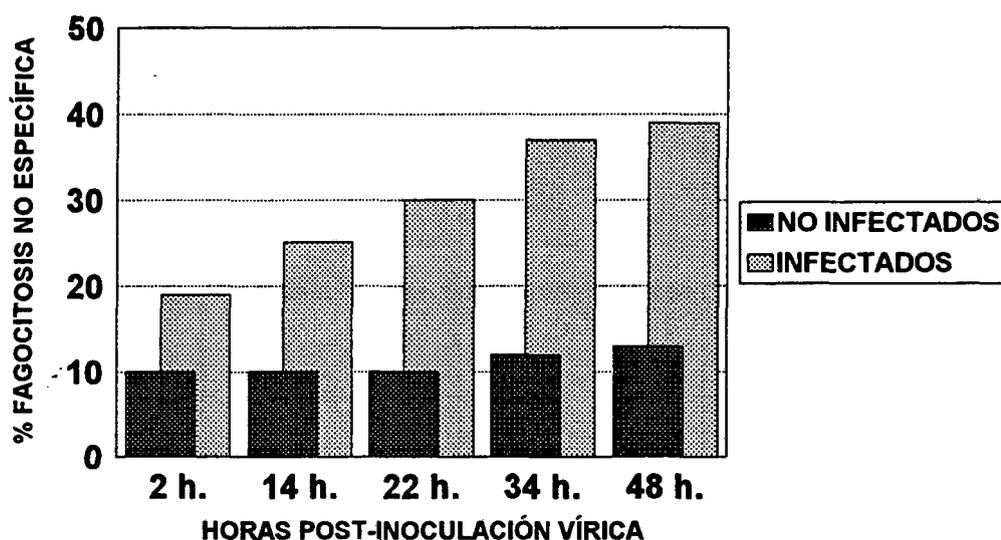


Tabla 2. Clasificación de los PAM infectados o no con PRRSv según la presencia y tamaño de vacuolas endocíticas en su citoplasma.

CATEGORIA*	2, 14, 22 h.		2 h.	14 h.	22 h.	34 h.		48 h.	
	NEG.	VIR.	VIR.	VIR.	VIR.	NEG.	VIR.	NEG.	VIR.
A	52	12	26	16	28	7	39	12	
B	22	19	40	22	12	15	13	24	
C	10	34	28	38	30	47	23	42	
D	10	27	5	20	20	24	11	11	
E	6	8	1	4	10	7	8	11	
TOTAL	100	100	100	100	100	100	100	100	

NEG. = control negativo para un tiempo/s PI vírico específico/s

VIR. = muestras con inoculación vírica

* A = PAM con vacuolización inaparente.

B = PAM con menos de 5 vacuolas endocíticas y de tamaño inferior a 1 μ m.

C = PAM con más de 5 vacuolas endocíticas y de tamaño inferior a 1 μ m.

D = PAM con menos de 5 vacuolas endocíticas y de tamaño superior a 1 μ m.

E = PAM con más de 5 vacuolas endocíticas y de tamaño superior a 1 μ m.

Algunos macrófagos mostraron la presencia de partículas víricas a nivel citoplasmático. Éstas se presentaron aisladamente y correspondieron a partículas con envuelta de unos 50-70 nm. de

diámetro con una nucleocápside central de unos 25-40 nm. de diámetro (Figura 4). En algunos casos, las partículas víricas se observaron acumuladas en vesículas citoplasmáticas (Figura 5). Los orgánulos relacionados con la morfogénesis del virus, tales como mitocondrias y aparato de Golgi, no se observaron dañados.

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

Al igual que en el experimento 1, el 95% o más de las células procedentes del lavado broncoalveolar fueron identificadas como PAM a través de la observación de extensiones directas y cortes semifinos a microscopio óptico. La viabilidad celular de las muestras estudiadas se encontró entre el 88 y 93% para todas ellas, siendo las diferencias entre tratamientos no significativas ($p>0.05$). La prueba de IFA para la detección de PRRSv demostró los mismos niveles y porcentajes de positividad observados para el experimento 1.

Ultraestructuralmente, los PAM presentaron las características comentadas ya en el experimento 1, con la diferencia de que las muestras inoculadas con *H. parasuis* presentaron una cantidad variable de células bacterianas en situación extracelular, o bien en proceso de internalización, internalizadas o digeridas. La cantidad de células con presencia de fagosomas y fagolisosomas se observó muy aumentada en los cultivos con bacterias, y entre éstos, especialmente los correspondientes a los tiempos de incubación de 30 y 90 minutos PI bacteriana (Tablas 3 a 6). No se pudo apreciar diferencias en cuanto a presencia de pseudopodios entre los diferentes cultivos. La presencia de vacuolas endocíticas también se encontró aumentada en los grupos con inoculación bacteriana respecto el resto de cultivos (Tabla 7), pero esta diferencia no fue significativa ($p>0.05$).

En la Figura 6 se muestran ejemplos de las categorías utilizadas en la clasificación ultraestructural. Ésta reveló diferencias significativas ($p<0.05$) entre el grupo control y el resto de tratamientos. El porcentaje de fagocitosis de *H. parasuis* (Figura 7) aumentó hasta los 30 minutos PI bacteriana para todos los grupos, obteniendo unos valores de entre el 54% (22 horas PI vírica) y 68% (2 horas PI vírica) de PAM con bacteria internalizada. El porcentaje de fagocitosis a los 90 minutos PI bacteriana resultó disminuido respecto a los 30 minutos, manteniéndose a unos niveles entre el 14% (tratamiento sin virus) y 32% (2 horas PI vírica). Los porcentajes de fagocitosis a los 30 minutos

fueron significativamente distintos a los de 0 y 90 minutos PI bacteriana ($p < 0.05$), pero no fueron distintos entre los diferentes grupos con o sin inoculación vírica ($p > 0.05$). Estadísticamente tampoco hubo diferencia entre los tiempos 0 y 90 minutos PI bacteriana ($p > 0.05$). Para los tiempos PI bacteriana, la media de bacterias internalizadas por célula fagocítica fue de 1 a los 0 minutos, 2 a los 30 minutos y 3 a los 90 minutos, independientemente del tiempo PI vírico. En algunos casos, pudo apreciarse que la ingestión de la bacteria ocurre preferencialmente en un polo de la célula, y no por toda la superficie del PAM (Figura 8).

El PCA no manifestó diferencias estadísticas entre grupos ($p > 0.05$) exceptuando respecto al control negativo, pero si manifestó una tendencia al aumento relacionada con el tiempo de incubación bacteriana (Tablas 3 a 6).

Solo en algunos macrófagos se detectó la presencia de virus, con unas características morfológicas y morfogénicas iguales a las descritas en el experimento 1. La presencia de *H. parasuis* en localización extra e intracelular fue un hallazgo constante en todas las muestras inoculadas con la bacteria, y se caracterizó por ser una bacteria pleomórfica de diámetro variable entre 1 y 3 μm . de longitud y 0.5 y 1 μm . de ancho, y encapsulada (Figura 9). La mayoría de vacuolas fagocíticas o fagosomas contenían 1 bacteria y, en algún caso, 2. De forma muy poco habitual se pudieron observar fagosomas con una presencia masiva de bacterias no digeridas (Figura 10), incluso alguna en estado de división. Ultraestructuralmente el proceso de fagocitosis se pudo dividir en distintas etapas que comprendieron la adherencia a la pared del PAM, formación de pseudopodios alrededor de la bacteria, incorporación de la bacteria en una vesícula citoplasmática o fagosoma en el interior del macrófago, proceso de fusión de lisosoma/s a este fagosoma con formación de fagolisosomas, destrucción de la integridad de la partícula bacteriana y formación de unas vesículas fagolisosomales con un contenido oscuro, amorfo y no identificable.

Tabla 3. Cambios ultraestructurales de PAM infectados con *Haemophilus parasuis* a los 0, 30 y 90 minutos PI.

CATEGORIA*	NEG.	B0m	B30m	B90m
A	68	36	5	2
B1	11	17	5	2
B2	9	12	3	4
B3	2	7	3	1
C	6	12	46	16
D	4	15	37	74
E	0	1	2	1
TOTAL	100	100	100	100
PCA**	32%	63%	93%	97%

NEG. = PAM no inoculados con virus y/o bacteria.

BXm. = PAM con tiempo de inoculación bacteriana de X minutos.

Tabla 4. Cambios ultraestructurales de PAM infectados con PRRSV a las 2 horas PI y *Haemophilus parasuis* a los 0, 30 y 90 minutos PI.

CATEGORIA*	NEG.	V2h	V2h/B0m	V2h/B30m	V2h/B90m
A	68	23	18	8	4
B1	11	20	14	19	2
B2	9	27	10	8	3
B3	2	15	3	6	4
C	6	16	22	46	19
D	4	4	33	14	63
E	0	5	0	4	5
TOTAL	100	100	100	100	100
PCA**	32%	72%	82%	88%	91%

NEG. = PAM no inoculados con virus y/o bacteria.

V2h = PAM con tiempo PI vírica de 2 horas.

BXm. = PAM con tiempo PI bacteriana de X minutos.

Tabla 5. Cambios ultraestructurales de PAM infectados con PRRSv a las 14 horas PI y *Haemophilus parasuis* a los 0, 30 y 90 minutos PI.

CATEGORIA*	NEG.	V14h	V14h/B0m	V14h/B30m	V14h/B90m
A	68	11	25	7	4
B1	11	16	11	8	8
B2	9	27	22	4	6
B3	2	25	11	7	10
C	6	18	17	42	17
D	4	8	13	27	54
E	0	3	1	5	1
TOTAL	100	100	100	100	100
PCA**	32%	86%	74%	88%	95%

NEG. = PAM no inoculados con virus y/o bacteria.

V14h = PAM con tiempo PI vírica de 14 horas.

BXm. = PAM con tiempo PI bacteriana de X minutos.

Tabla 6. Cambios ultraestructurales de PAM infectados con PRRSv a las 22 horas PI y *Haemophilus parasuis* a los 0, 30 y 90 minutos PI.

CATEGORIA*	NEG.	V22h	V22h/B0m	V22h/B30m	V22h/B90m
A	68	11	15	5	0
B1	11	13	5	3	2
B2	9	27	20	6	2
B3	2	23	11	5	2
C	6	22	24	51	15
D	4	11	23	33	78
E	0	3	2	3	1
TOTAL	100	100	100	100	100
ACT. CELULAR**	32%	86%	83%	92%	99%

NEG. = PAM no inoculados con virus y/o bacteria.

V22h = PAM con tiempo PI vírica de 14 horas.

BXm. = PAM con tiempo PI bacteriana de X minutos.

* Para tablas 3 a 6:

A = PAM en reposo (<5 lisosomas/célula).

B = PAM con mayor número de lisosomas (B1, entre 5 y 10 lisosomas/célula; B2, entre 10 y 20 lisosomas/célula; B3, más de 20 lisosomas/célula).

C = PAM con presencia de fagosomas.

D = PAM con presencia de fagolisosomas.

E = PAM con pérdida de su integridad ultraestructural.

** Porcentaje de Células Activadas.

Tabla 7. Clasificación de los PAM infectados o no con PRRSv según la presencia y tamaño de vacuolas endocíticas en su citoplasma, a 0, 30 y 90 minutos PI bacteriana.

CATEGORÍA*	NO VIRUS				VIRUS 2 h. PI			
	NEG.	B0m	B30m	B90m	NEG.	B0m	B30m	B90m
A	52	14	8	12	12	42	18	29
B	22	25	21	9	19	25	32	34
C	10	33	27	41	34	19	16	22
D	10	21	26	29	27	8	22	8
E	6	7	18	9	8	6	12	7
TOTAL	100	100	100	100	100	100	100	100

CATEGORÍA*	VIRUS 14 h. PI				VIRUS 22 h. PI			
	NEG.	B0m	B30m	B90m	NEG.	B0m	B30m	B90m
A	26	28	10	12	16	32	18	22
B	40	24	34	18	22	38	20	35
C	28	22	31	31	38	16	26	30
D	5	13	15	24	20	7	23	6
E	1	13	10	15	4	7	13	7
TOTAL	100	100	100	100	100	100	100	100

NEG. = muestras no inoculadas con bacteria para cada uno de los tratamientos.
 BXm = PAM con tiempo X PI bacteriana.

* A = PAM con vacuolización inaparente

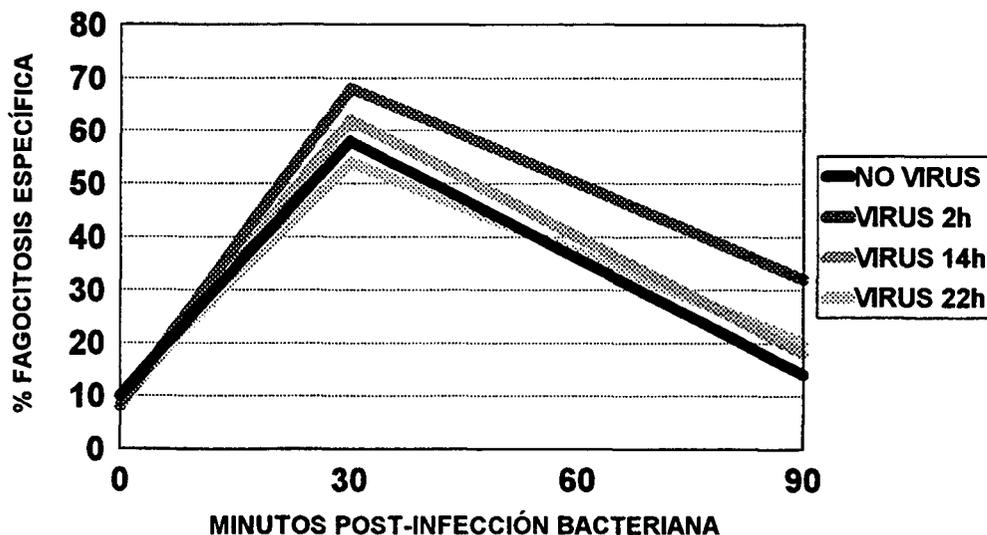
B = PAM con menos de 5 vacuolas endocíticas y de tamaño inferior a 1 µm.

C = PAM con más de 5 vacuolas endocíticas y de tamaño inferior a 1 µm.

D = PAM con menos de 5 vacuolas endocíticas y de tamaño superior a 1 µm.

E = PAM con más de 5 vacuolas endocíticas y de tamaño superior a 1 µm.

Figura 7. Porcentaje de PAM con bacteria/s internalizada/s infectados previamente 2, 14 y 22 horas o no con PRRSv. El proceso de fagocitosis fue estudiado hasta los 90 minutos PI bacteriana.



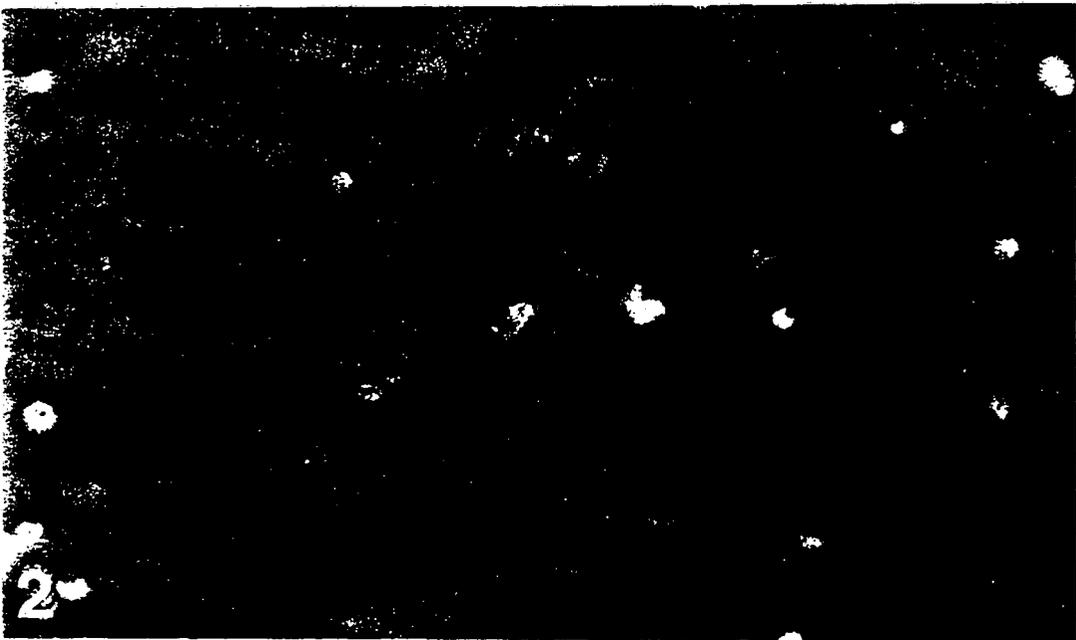
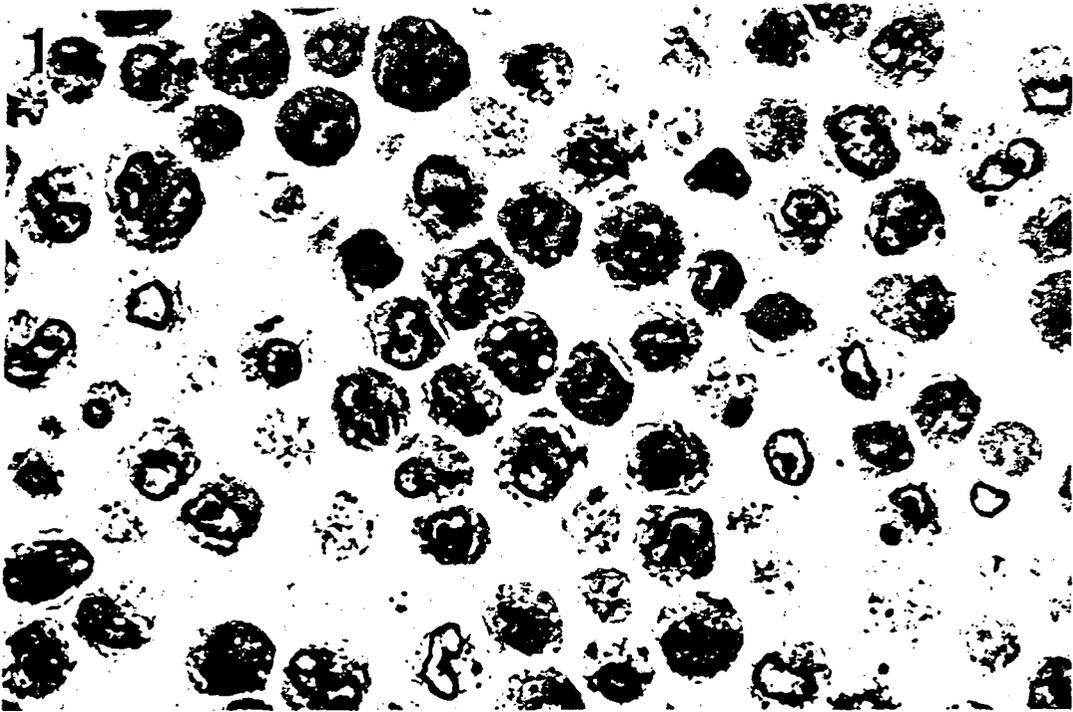


Figura 1. Macrófagos alveolares porcinos correspondientes al lavado broncoalveolar de un cerdo de 6 semanas de edad. Corte semifino. Tinción de azul de toluidina. Aumento original: 1000x.

Figura 2. Prueba de IFA sobre macrófagos alveolares. La fluorescencia verde indica la presencia del PRRSv en el interior de las células. Aumento original: 400x.

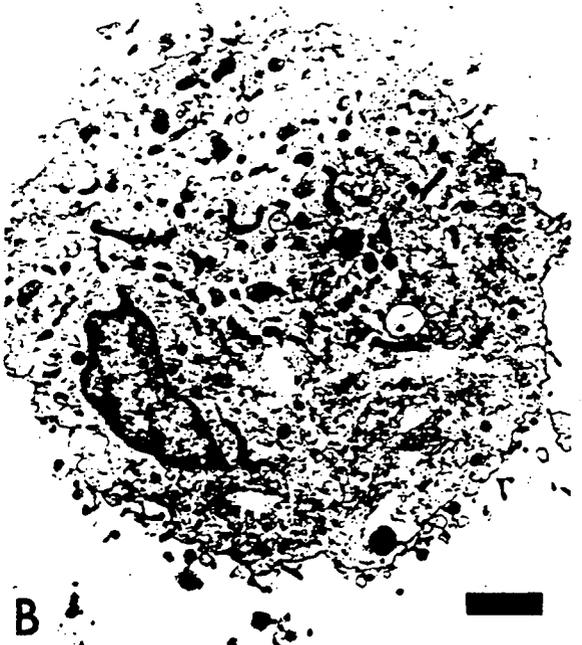


Figura 6. Clasificación ultraestructural de los PAM. Ejemplos de cada una de las categorías (A, B, C, D y E) presentadas en el apartado de material y métodos. Barra: 1 μ m.

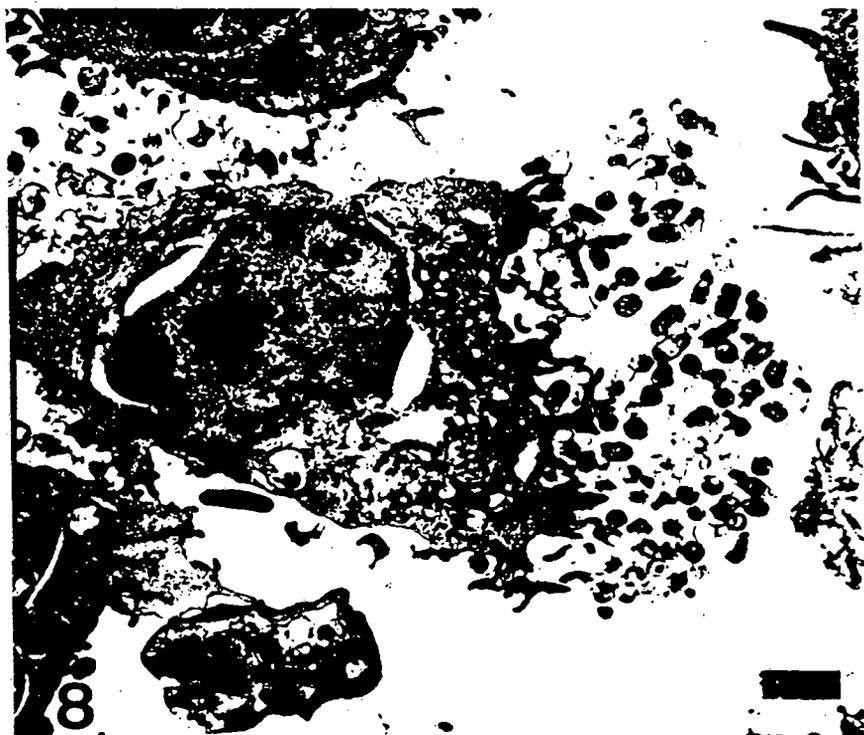


Figura 4. PRRSV. Las partículas víricas usualmente presentaban una envuelta de un diámetro de 50-70 nm. y una nucleocápside central de unos 25-40 nm. Barra: 50 nm.

Figura 5. Acúmulo de partículas víricas en vacuolas citoplasmáticas de un PAM. Barra: 150 nm.

Figura 8. PAM fagocitando *H. parasuis*. En algunos casos, la fagocitosis de la bacteria se produjo preferencialmente en un polo celular. Barra: 1 μ m.

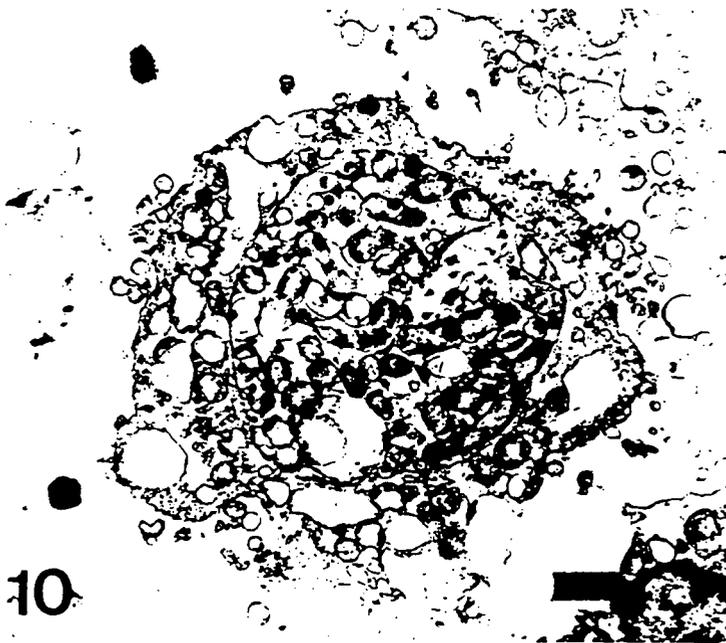


Figura 9. *H. parasuis*. Aspecto ultraestructural de un corte longitudinal de la bacteria. Barra: 100 nm.

Figura 10. Fagosoma repleto de *H. parasuis*. En algunos casos se observó la masiva presencia de bacterias en el interior de fagosomas de PAM. Barra: 1 μ m.

5.4 DISCUSIÓN

El PAM es considerado como la célula diana y punto de replicación primario del PRRSv (Ohlinger et al., 1991; Wensvoort et al., 1991; Collins et al., 1992; Benfield et al., 1992). Además, en condiciones naturales, los macrófagos alveolares (AM) constituyen una de las primeras barreras con las que se ponen en contacto los agentes bacterianos que tienen entrada al organismo por la vía respiratoria (Green et al., 1977; Lehnert et al., 1985; Herscowitz, 1985; Adams y Hamilton, 1992). Estos dos hechos apuntan al PAM como una célula fundamental en la patogenia de las enfermedades respiratorias que afectan a la especie porcina.

En el Experimento 1 se muestran los efectos secuenciales que la infección por PRRSv provoca en los PAM a nivel estructural. Los resultados de este estudio mostraron que la infección *in vitro* con el PRRSv provoca cambios ultraestructurales evidentes en estas células. Estas alteraciones se caracterizan por un notable aumento del número de lisosomas en el citoplasma y un moderado aumento en el número de fagosomas y fagolisosomas. Previamente otros estudios han descrito cambios en la estructura de los PAMs, especialmente relacionados con la morfogénesis del PRRSv (Paton et al., 1992; Pol y Wagenaar, 1992; Pol et al. 1995).

Los cambios observados, y especialmente el gran aumento en número de lisosomas, probablemente responden a una activación de la célula infectada, básicamente marcada en las primeras 22 horas PI. Estados de activación y/o metabolismo más avanzado, caracterizados por la mayor presencia de fagosomas y fagolisosomas, fueron observados predominantemente en horas posteriores (34 y 48 horas PI). Este hecho concuerda con las observaciones de otros autores (Paton et al., 1992; Pol et al., 1995) que definen un rápido proceso de degeneración de los PAMs infectados. No obstante, en nuestro estudio no ha podido observarse la casi completa destrucción de las células en las primeras 48 horas PI, tal como otros autores han sugerido (Paton et al., 1992). Estas diferencias podrían deberse a diversos factores, tales como la cantidad de virus usada en la inoculación, la cepa de virus utilizada, el nivel de pases del virus en cultivo, el tipo de estudio micrográfico y el tipo de medio en el cual se realizó la infección.

La utilización de una dosis de 1 MOI fue escogida como un nivel de infección relativamente elevado, pero más cercana a las posibilidades de infección natural que en otros estudios realizados sobre la morfogénesis del PRRSv en PAMs, donde se utilizan dosis próximas a 10 MOI (Pol et al., 1995) o dosis desconocidas o no indicadas (Paton et al., 1992). Según la técnica de IFA, esta dosis permitió lograr infección en 2-4% de los PAMs presentes en cultivo, resultando muy similar a los niveles de infección conseguidos habitualmente en la infección *in vivo* por PRRSv (Van Reeth, 1995). Estos datos no son extrapolables a otros virus pertenecientes a la nueva familia Arteriviridae, dado que en el caso del LDV es necesaria una dosis de 50-500 MOI para lograr la infección *in vitro* del 8% de las células de la teórica población de macrófagos alveolares más permisivos (Stueckemann et al., 1982). No obstante, a tenor de los cambios ultraestructurales descritos en este capítulo, parece contradictorio encontrar un bajo porcentaje de PAMs infectados con virus por la técnica de IFA (2-10%) pero un relativamente elevado PCA. Uno de los factores que pueden relacionarse con este hecho es el tipo de clasificación ultraestructural utilizada; ésta supone un análisis muy fino en cuanto a presencia de lisosomas y estos cambios son realmente de poca entidad a efectos de activación celular. Además, la infección vírica de PAM produce la secreción de citoquinas como alfa-interferon (IFN-alfa), factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-alfa) e interleucina 6 (IL-6) al medio, que pueden afectar a otros PAM no infectados y provocar su activación (Gendelman y Morahan, 1992).

La cepa vírica utilizada en los Experimentos 1 y 2 fue la cepa de referencia americana, VR 2332. Hasta el momento solo existe un trabajo en el que se comparan los efectos de replicación y morfogénesis de las cepas europea (Lelystad) y americana, tanto en PAM como en línea celular CL 2621 (Pol et al., 1995). De este estudio se desprende que la cepa europea se encuentra mejor adaptada a la propagación en PAM que la americana, la cual tiene mayor facilidad de propagación en línea celular CL 2621. La detección de antígenos citoplasmáticos y la presencia de partículas víricas en la infección *in vitro* con la cepa europea es anterior a la que se obtiene con la cepa americana (antígenos citoplasmáticos a las 6 horas PI y partículas víricas a las 9 horas PI en caso del virus Lelystad y a las 12 horas PI para el virus VR 2332 tanto para antígenos como partículas víricas). Estos datos podrían sugerir que los efectos citopáticos con la cepa europea se producen más tempranamente.

Este último punto podría estar en contradicción con los resultados del Experimento 1, en el cual, por la técnica de IFA se detectaron antígenos citoplasmático a las 2 horas PI. Se sabe que los virus pertenecientes a la sugerida familia Arteriviridae presentan un ciclo de replicación muy rápido: 7-12 horas para el LDV, 6-8 horas para el EAV y 8-10 horas para el SHFV, pero en ningún caso baja de las 6 horas. El hallazgo de positividad a las 2 horas PI podría representar la presencia de partículas víricas en el interior de algunos PAM fruto de la entrada del virus en ellos, pero probablemente no de su replicación. De hecho, en el Experimento 1, la primera observación directa del PRRSv en el interior de PAM a través de microscopía electrónica de transmisión se realizó a las 14 horas PI, en consonancia con otros estudios publicados tanto en PAM como en línea celular MARC-145 (Mardassi et al., 1994; Dea y Athanassious, 1994). En conclusión a este punto, es necesario tener en cuenta el tipo de cepa utilizado para el estudio en caso de establecer comparaciones sobre el efecto citopático del virus sobre PAM.

El número de pases de virus en cultivo celular puede ser también un factor importante en el desarrollo del efecto citopático. De hecho, la cepa vírica JJ1882, virus atenuado utilizado en la vacuna contra los procesos respiratorios del PRRS (RespPRRS), fue obtenida por pases de cultivo celular de la cepa VR 2332 (Polson, 1994). Por otro lado, el testaje de un virus de cepa americana de pase 8 no causó ni síntomas clínicos ni lesiones en cerdos de 4 semanas inoculados intranasalmente con una dosis de $10^{4.5}$ TCID₅₀, aunque todos los animales habían seroconvertido el día 11 PI (datos no mostrados), lo cual sugiere que un número bajo de pases en cultivo modifica la patogenicidad *in vivo* del PRRSv.

El estudio micrográfico realizado también puede ser un factor de variación. Otros estudios mostrando los efectos de la infección por PRRSv en PAM han utilizado microscopía electrónica de barrido y no de transmisión para la valoración del efecto citopático (Paton et al., 1992).

Otro factor de variabilidad que podría ser importante es el tipo de medio y soporte en el cual se realizó la técnica de infección. Es sabido que el contacto de los macrófagos con un soporte sólido adecuado provoca su adherencia y, a la vez, su activación (Herscowitz y Cole, 1981; Fels y Cohn, 1986). Este fenómeno ya puede suponer la existencia de diferencias ultraestructurales entre PAM mantenidos en suspensión, rotación y evitando su adhesión a la pared de los tubos gracias a la siliconización de éstos (caso de los experimentos 1 y 2), y PAM mantenidos en

cultivo sobre soporte plástico o de cristal permitiendo su adherencia (Paton et al., 1992; Pol y Wagenaar, 1992; Pol et al., 1995). Al menos en monocitos se ha demostrado que su activación por adherencia a superficies o por estimulación químico-biológica supone un aumento importante a la susceptibilidad a la replicación del PRRSv (Molitor et al., 1995). De esta manera, parte de la diferencia en efecto citopático mostrado en el experimento 1 y otros autores (Paton et al., 1992) podría ser debida a este último punto.

Otros factores a tener en cuenta serían que no todos los PAM son igualmente sensibles a la replicación vírica (Van Reeth, 1995), que la distinta proporción de las subpoblaciones de PAM puede ser un factor de variación según animal (Choi et al., 1995) y que algunos aislamientos víricos si se replican en PAM (inmunomarcaje positivo) pero no obstante no provocan efecto citopático (Bautista et al., 1993).

La morfología del PRRSv y la localización de éste en el citoplasma y vacuolas citoplasmáticas observadas en el experimento 1 se encuentra en plena concordancia con estudios anteriores (Pol y Wagenaar, 1992; Benfield et al., 1992; Wensvoort et al., 1992; Mardassi et al., 1994; Pol et al., 1995).

La utilización de tiempos de incubación vírica de 2, 14 y 22 horas se realizó en consonancia con otros estudios anteriores realizados con el mismo virus (Galina et al., 1994; Galina, 1994). En estos trabajos se realizó un estudio funcional de la doble infección PRRSv - *Streptococcus suis* tipo II, de forma muy similar al descrito en el Capítulo 6 de esta tesis, con el objeto de establecer comparaciones en cuanto a mecanismos patogénicos de los dos agentes (*S. suis* y *H. parasuis*) referidos a los PAM.

Algunos estudios muy similares de infección vírica de macrófagos alveolares han sido realizados por otros autores (Silverberg et al., 1979; Stueckemann et al., 1982; Fuentes, 1986). En PAM solo se describe un estudio de infección con el virus de Aujeszky en el cual se demostró un efecto de aumento de lisosomas, fagosomas y fagolisosomas respecto a los grupos controles (Fuentes, 1986), hallazgos también descritos en el este trabajo. La proliferación de gránulos lisosomales también ha sido descrita en la infección de AM de ratón con virus parainfluenza (Silverberg et al., 1979).

En el experimento 2 se realizó el estudio de la infección de PAM con el PRRSv y la bacteria *H. parasuis* opsonizada. Con ello se pretendió estudiar los mecanismos ultraestructurales de la fagocitosis mediada por receptores Fc de *H. parasuis* por parte de los PAM infectados con PRRSv. Hasta el momento solo se ha descrito un estudio de fagocitosis realizado con PAM infectados con el PRRSv (Galina et al., 1994; Galina, 1994). En este estudio, de carácter funcional y no estructural, se observó que el virus tiene un efecto de activación sobre las células, de manera que a tiempo de 22 horas PI vírica, los PAM presentaron una cantidad de fagocitosis superior a los PAMs no infectados. Este fenómeno también fue parcialmente observado en el experimento 2; según los resultados obtenidos, el PRRSv si provocó un ligero efecto de activación de los macrófagos en términos de porcentaje de fagocitosis frente a *H. parasuis*, pero ello se daría especialmente a las 2 horas PI. No obstante, la diferencia entre grupo no infectado y grupos infectados a distintos tiempos no fue significativa.

La presencia de bacteria provoca un aumento muy significativo de la presencia de fagosomas especialmente, y fagolisosomas en los PAM, conteniendo la mayoría de ellos bacteria/s o resto de bacterias en su interior. Estos hallazgos son comparables a los observados por la infección dual por el virus de Aujeszky y *Pasteurella multocida* en PAM (Fuentes, 1986). En otros estudios se ha postulado que algunos virus pueden afectar negativamente a la fagocitosis de bacterias por parte de macrófagos alveolares, alterando básicamente el proceso de fusión fagosoma-lisosoma (Silverberg et al., 1979; Pijoan et al., 1980; Fuentes y Pijoan, 1986; Iglesias et al., 1992). Los resultados de nuestro experimento sugieren que este no es el caso del PRRSv. Ultraestructuralmente se pudo observar la fusión del fagosoma y lisosoma, y a los 90 minutos PI pueden observarse un gran número de restos bacterianos digeridos, equivalentes a los existentes en el caso de fagocitosis directas de bacterias por parte de macrófagos alveolares sin inóculo vírico previo (Silverberg et al., 1979).

Los resultados obtenidos demuestran que los PAM fagocitan *H. parasuis* opsonizado con o sin previa infección vírica, alcanzando unos niveles del 50-70% de células con bacteria internalizada a los 30 minutos PI. El estudio ultraestructural de PAM infectados con virus y bacteria se realizó a un máximo de tiempo de 90 minutos PI dado que la mayoría de autores describen que entre 15 y 60 minutos PI se ha realizado un 75% o más de la fagocitosis bacteriana en condiciones *in*

vitro (Swanson y Zeligs, 1974; Maheswaran et al., 1980; Vray et al., 1981; Zick et al., 1982; Fuentes, 1986; Galina et al., 1994). No obstante, a pesar de que los PAM si fagocitaron *H. parasuis*, este es un proceso que no se realizó de forma extensiva, dado que en las secciones estudiadas la media de bacterias por células con bacteria internalizada fue relativamente baja (entre 1 y 3 bacterias según tiempo PI bacteriana) en relación con el número de bacterias presentes extracelularmente (relación de infección de 25 bacterias/PAM). Este fenómeno también fue observado en la infección dual de PAMs con virus de Aujeszky y *P. multocida* (Fuentes, 1986), y podría ser debido a la mayor dificultad de los macrófagos alveolares en la fagocitosis de bacterias gram-negativas (Green y Kass, 1963; Horwitz, 1982; Roitt et al., 1986).

Solo en algunas raras ocasiones se pudieron observar PAM con grandes fagosomas conteniendo incluso más de 15 bacterias, especialmente a los 90 minutos PI. El mecanismo por el cual este fenómeno se da en algunas células es desconocido, pero la existencia de distintas subpoblaciones de PAMs con distintas capacidades fagocíticas (Choi et al., 1995) podría sugerir que un muy bajo porcentaje de células tendrían una mayor capacidad de fagocitosis e incorporarían en poco tiempo un número de bacterias muy elevado. Paralelamente, las bacterias observadas en el interior de estos fagosomas en ningún caso se observaron digeridas o en proceso de digestión.

En algunos casos se observó que la ingestión de las bacterias se realizaba en un polo de la célula que adoptaba forma cóncava. Este fenómeno ha sido descrito por otros autores en macrófagos alveolares (Stendahl et al., 1980; Vray et al., 1981), y se sugirió una posible migración de pseudópodos hacia un polo dando una forma de copa donde, en elevado porcentaje, tendría lugar el proceso de fagocitosis.

A través de los experimentos 1 y 2 puede concluirse que el PRRSv si tiene un efecto sobre la ultraestructura de los PAM, y que este se puede interpretar como activación celular, pero no como destrucción o degeneración masiva. Esta activación se traduce con un aumento básicamente de lisosomas, pero también de fagosomas y fagolisosomas. Además, estos PAM tienen capacidad de fagocitar *H. parasuis*, aunque a bajos niveles, y el PRRSv no parece tener un efecto muy marcado sobre esta fagocitosis, aunque se observa que los PAM infectados 2 horas PI vírica tienden a fagocitar un mayor número de bacterias que el resto.

5.5 BIBLIOGRAFIA

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

Macrophages as destructive cells in host defense. En: *Inflammation: Basic principles and clinical correlates*, 2nd. Ed. Gallin, Goldstein & Snyderman Eds., Raven Press, Ltd., 637-662, 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.

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, 1992.

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.

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., aceptado, 1995.

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.

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.

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.

FENNER, F.; BACHMANN, P.A.; GIBBS, E.P.J.; MURPHY, F.A.; STUDDERT, M.J.; WHITE, D.O.

Classification and nomenclature of viruses. En: *Veterinary virology*. Academic Press, Inc., 21-38, 1987.

FELS, A.O.S.; COHN, Z.A.

The alveolar macrophage.

J. Appl. Physiol., 60: 353-369, 1986.

FUENTES, M.

Ultrastructural features on alveolar macrophages from pigs with experimental PRV-*P. multocida* pneumonia. En: *Studies on the role of Pseudorabies virus in Pasteurella pneumonia in swine*.

PhD Thesis, University of Minnesota, 1986.

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.

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, Thailand, 142, 1994.

GALINA, L.

Phagocytosis and intracellular survival of *Streptococcus* in normal and PRRSv-infected swine alveolar macrophages.
PhD Thesis, University of Minnesota, 1994.

GENDELMAN, H.E.; MORAHAN, P.S.

Macrophages in viral infections.

En: *The natural immune system: the macrophage*. Lewis y McGee Ed., IRL Press, Oxford, 157-213, 1992.

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.

GREEN, G.M.; KASS, E.H.

The role of the alveolar macrophage in the clearance of bacteria from the lung.

J. Exp. Med., 119: 167-176, 1964.

HERSCOWITZ, H.B.

In defense of the lung: paradoxical role of the pulmonary alveolar macrophage.

Ann. Allergy, 55: 634-648, 1985.

HERSCOWITZ, H.B.; COLE, D.E.

Maintenance of macrophages *in vitro*. En: *Manual of macrophage methodology: collection, characterization and function*. Herscowitz, Holden, Bellanti & Ghaffar Eds.

Immunology Series, vol. 13, 161-184, 1981.

HORWITZ, M.A.

Phagocytosis of microorganisms.

Rev. Infect. Dis., 4 (1): 104-123, 1982.

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.

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.

LEHNERT, B.E.; VALDEZ, Y.E.; HOLLAND, L.M.

Pulmonary macrophages: alveolar and interstitial populations.

Exp. Lung Res., 9: 177-190, 1985.

MAHESWARAN, S.K.; BERGGREN, K.A.; SIMONSON, R.R.; WARD, G.E.; MUSCOPLAT, C.C.

Kinetics of interaction and fate of *Pasteurella hemolytica* in bovine alveolar macrophages.

Infect. Immunity, 30 (1): 254-262, 1980.

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, 1994.

- 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.
Virology, 192: 62-72, 1993.
- 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.
Immunity to PRRS: double edge sword.
Proc. II International Symposium on PRRS, Immunology, 9, 1995.
- 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.
- 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.
- PIJOAN, 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.
- PIJOAN, C.; SOLANO, G.I.; SEGALÉS, J.
PRRS virus and secondary disease.
Proc. Allen D. Leman 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-stranded RNA viruses.
Adv. Virus Res., 41: 99-192, 1992.
- POL, J.M.A.; WAGENAAR, F.
Morphogenesis of Lelystad virus in porcine alveolar macrophages.
Am. Assoc. Swine Pract., 4 (4): 29, 1992.
- POL, J.M.A.; WAGENAAR, F.; REUS, J.E.G.
Comparative morphogenesis of three PRRS virus strains.
Vet. Microbiol., accepted, 1995.
- POLSON, D.D.
RespPRRS: a PRRS vaccine review.
PRRS/respPRRS Reference Guide, NOBL Labs., 1995.

ROITT, I.M.; BROSTOFF, J.; MALE, D.K.

Inmunidad frente a virus, bacterias y hongos. En: *Inmunología*, MEDSI, Ed., 16.1-16.9, 1986.

SILVERBERG, B.A.; JAKAB, G.J.; THOMSON, R.G.; WARR, G.A.; BOO, K.S.

Ultrastructural alterations in phagocytic functions of alveolar macrophages after Parainfluenza virus infection. *J. Reticulo. Soc.*, 25 (4): 405-416, 1979.

STENDAHL, O.I.; HARTWIG, J.H.; BROTSCHI, E.A.; STOSSEL, T.P.

Distribution of actin-binding protein and myosin in macrophages during spreading and phagocytosis. *J. Cell Biol.*, 84: 215, 1980.

STUECKEMANN, J.A.; RITZI, D.M.; HOLTH, M.; SMITH, M.S.; SWART, W.J.; CAFRUNY, W.A.; PLAGEMANN, P.G.W.

Replication of Lactate Dehydrogenase-elevating virus in macrophages. 1. Evidence for cytotoxic replication. *J. Gen. Virol.*, 59: 245-262, 1982.

SWANSON, J.; ZELIGS, B.

Studies on *Gonococcus* infection. VI. Electron microscopy study on in vitro phagocytosis of gonococci by human leukocytes.

Infect. Immunity, 10 (3): 645-656, 1974.

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.

Pathogenesis and clinical manifestations of respiratory PRRSv infection.

Proc. II International Symposium on PRRS, Immunology, 19, 1995.

VRAY, B.; SAINT-GUILLAN, M.; LELOUP, R.; HOEBEKE, J.

Kinetic and morphologic studies of rat macrophage phagocytosis.

J. Reticulo. Soc., 29 (4): 307-319, 1981.

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.

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, 1992.

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, 1994.

ZINK, M.C.; JOHNSON, J.A.; PRESCOT, J.F.; PASCOE, P.J.
The interaction of *Corynebacterium equi* and equine alveolar macrophages *in vitro*.
J. Reprod. Fert., Suppl., 32: 491-496, 1982.

CAPÍTULO 6:

**ESTUDIO FUNCIONAL *IN VITRO* DE
MACRÓFAGOS ALVEOLARES PORCINOS
INFECTADOS DUALMENTE
CON PRRSv Y *Haemophilus parasuis***

6.1 INTRODUCCIÓN

Los últimos estudios sobre interacción entre el PRRSv y otros agentes víricos o bacterianos, incluyendo los resultados obtenidos en el Capítulo 4, no han sido capaces de corroborar la evidencia clínica de tal interacción (Carvalho et al., 1995; Cooper et al., 1995; Pol et al., 1995; Van Reeth y Pensaert, 1995). Concretamente, en el Capítulo 4 se muestra que, en las condiciones experimentales utilizadas, la presencia del PRRSv no facilita la presentación de enfermedad clínica debida a *H. parasuis*; de hecho, los resultados sugieren un efecto contrario.

Teniendo en cuenta que el PRRSv se multiplica selectivamente en PAMs *in vivo* y en cultivos primarios de PAM *in vitro* (Benfield et al., 1992; Goyal, 1993), es evidente que la replicación vírica tiene un efecto sobre la funcionalidad de estas células, y ello ha sido estudiado específicamente sobre dos funciones, fagocitosis y digestión post-fagocítica, con *Streptococcus suis* tipo II (Galina, 1994; Galina et al., 1994). Con *S. suis* se ha demostrado que existe un efecto de potenciación de la capacidad de supervivencia intracelular, hecho que favorece la posibilidad teórica de que, *in vivo*, pueda producir un cuadro patológico de meningitis. No obstante, existen también otros resultados *in vivo* en los cuales no se ha logrado reproducir esta interacción (Cooper et al., 1995).

El objetivo de este capítulo es estudiar los aspectos funcionales de la fagocitosis y digestión post-fagocítica de *H. parasuis* por parte de PAM infectados o no con el PRRSv.

6.2 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. La traquea y los 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 contaje y viabilidad celular utilizando un hematocitómetro (cámara de Neubauer) y la tinción de azul tripano. Finalmente, la concentración de células fue ajustada a 2×10^6 PAM/ml.

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, que correspondió a una partícula vírica procedente de una suspensión de 10^8 TCID₅₀/ml. por PAM presente en cultivo. Se realizaron 3 grupos de inoculación vírica, cumpliéndose 2, 14 y 22 horas PI. Después de estas incubaciones se realizó de nuevo el test de viabilidad del azul tripano y el resto de PAM fueron centrifugados a 1600 rpm y lavados por 3 veces con RPMI-1640 sin antibióticos ni antifúngicos. A continuación se realizó la infección bacteriana.

Inóculo bacteriano: Se utilizó la cepa 29755 de *H. parasuis*, de serovar 5. La bacteria fue marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC). El proceso de marcaje consiste en la suspensión del sedimento bacteriano en una solución de 0.1 mg. FITC/ml. PBS 0.1 M durante 45 minutos en rotación y en una estufa de CO₂. Para determinar fagocitosis mediada por receptores de la fracción cristalina de las inmunoglobulinas (Fc) se realizó una opsonización de la bacteria incubándola durante 45 minutos con una solución al 10% de suero de cerdo hiperimmune contra *H. parasuis* serotipo 5. Se realizó el contaje de la bacteria por cuentas viables y de la suspensión final (10^9 UFC/ml) se realizó una inoculación de 25 bacterias por PAM presente en cultivo.

Inmunofluorescencia indirecta (IFA) para la detección de PRRSV: Paralelamente, para cada muestra procesada, 2 horas antes de cumplirse el tiempo de incubación vírica deseado, se tomó una alícuota 200 ml. de suspensión de PAM que se colocó en un pocillo de cristal con un cubreobjetos redondeado de 0.8 cm. de diámetro en el fondo. Se permitió la adherencia de los PAM durante 2 horas al cubreobjetos y posteriormente se realizó la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFA), previamente descrita en la literatura (Yoon et al., 1992), sobre las muestras.

Test de Fagocitosis: Se realizó una modificación de la técnica que utiliza FITC y Bromuro de Etidio (EB), que permite la diferenciación entre bacteria extra e intracelular (Drevets y Campbell,

1991). Se aplicó este test a bacteria opsonizada y no opsonizada. Brevemente, 5 ml. de una suspensión de 2×10^6 PAM/ml para cada tratamiento (PAM no infectados con PRRSv y PAM infectados con PRRSv a las 2, 14 y 22 horas PI) fueron situados en tubos de polipropileno y mezclados con 250 ml. de una suspensión de 1×10^9 UFC/ml. (relación de 25 bacterias marcadas con FITC por PAM). Las muestras fueron incubadas en constante rotación a 37°C en una estufa con 5% de CO_2 . A los 0, 30, 60, 90 y 120 minutos PI bacteriana, se extrajeron alicuotas de 1 ml. para cada tratamiento y fueron resuspendidas en 3 ml. de PBS 0.1 M a 4°C y colocadas en hielo con el objeto de detener la acción fagocítica de los PAMs. Las muestras fueron lavadas 2 veces con PBS a 4°C y al sedimento celular le fueron añadidos 200 μl . de fijador, permitiendo su fijación durante 5 minutos. Posteriormente se realizaron 2 lavados más y se añadieron 6 μl . de EB (a concentración de 5 mg/ml. en PBS 0.1 M), incubando 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras fueron lavadas 2 veces más y almacenadas a 4°C en ausencia de luz. El porcentaje de fagocitosis fue estimado calculando el porcentaje de PAM conteniendo *H. parasuis* con FITC a través de un citómetro de flujo (Coulter Electronics XL Flow Cytometer). Se contaron 10.000 células para cada tiempo de incubación y tratamiento. El experimento fue repetido tres veces con bacteria opsonizada (Fag-Ops. 1, 2 y 3) y dos veces con bacteria no opsonizada (Fag-No-Ops. 1 y 2).

Test de Muerte Intracelular: Esta prueba se realizó a través de la adaptación de la técnica de Naranja de Acridina (OA) y Cristal Violeta (CV), que permite diferenciar microorganismos intracelulares vivos y muertos (Williams, 1990). Se incluyeron 4 grupos equivalentes a los del test de fagocitosis: PAM no infectados con PRRSv y PAM infectados con PRRSv a las 2, 14 y 22 horas PI. A cada grupo de tratamiento (2 ml. de suspensión de PAM por tratamiento) le fueron inoculadas tanto bacterias opsonizadas como sin opsonizar, consiguiendo una relación de 25 bacterias por PAM. Después de 1 hora en rotación en estufa a 37°C con 5% de CO_2 los PAM fueron lavados 3 veces con PBS 0.1 M con el objeto de eliminar el remanente de bacteria no fagocitada hasta ese momento, y resuspendidos de nuevo en RPMI-1640. Se recogieron alicuotas de 1 ml. después de 1 y 2 horas de rotación a 37°C en estufa de 5% de CO_2 . Las muestras fueron teñidas con 500 μl . de AO (solución de 14.4 mg. de AO en 100 ml. de PBS 0.1 M a $\text{pH} = 7.2$) durante 40 segundos, y lavadas 2 veces con PBS 0.1 M a 4°C . El sedimento celular obtenido fue teñido con 500 μl . de CV (solución de 50 mg. de CV en 100 ml. de PBS 0.1 M de $\text{pH} = 7.2$) durante 2 minutos a temperatura ambiente. Se resuspendieron con 2 ml. de PBS 0.1 M y se realizaron 2 lavados con la misma solución tampón. Las células fueron observadas a través de un

microscopio de luz ultravioleta y se contaron 50 PAM con o sin bacteria internalizada por tratamiento y tiempo de incubación. Bacterias vivas en el interior de PAM mostraron fluorescencia verde y bacterias muertas mostraron fluorescencia naranja. El porcentaje de muerte intracelular fue calculado dividiendo la media de bacterias muertas por PAM por la media total de bacterias internalizadas por PAM. El experimento fue repetido 2 veces con bacteria opsonizada (MI-Ops. 1 y 2) y otras 2 veces con bacteria no opsonizada (MI-No-Ops. 1 y 2).

Análisis estadístico: Tanto para el test de fagocitosis como para el test de muerte intracelular se realizó el test de medidas repetidas del análisis de la varianza. Las comparaciones fueron establecidas con el objeto de comparar efecto vírico y efecto bacteriano. Las diferencias entre tratamientos se consideraron significativas cuando $p < 0.05$.

6.3 RESULTADOS

6.3.1 Lavado Broncoalveolar

Aproximadamente un 95-98% de las células procedentes del lavado broncoalveolar fueron identificadas como PAM en base a sus características morfológicas a través de microscopía óptica. El resto de células fueron identificadas como linfocitos, neutrófilos y eritrocitos. La viabilidad de estos PAM calculada a través de la prueba del azul tripano fue del 94% en la suspensión inicial de macrófagos. Después de la inoculación vírica la viabilidad se mantuvo muy elevada, alcanzando un valor del 89% a las 22 horas PI vírica. Las diferencias en viabilidad entre los distintos tratamientos no fueron significativas ($p > 0.05$).

6.3.2 Inmunofluorescencia indirecta (IFA) para la detección de PRRSV

La prueba de IFA dió resultado positivo para todos los tiempos PI vírica. Al igual que en los experimentos del Capítulo 5, el porcentaje de células positivas fue muy bajo: menor del 1% a las 2 horas PI vírica y entre el 2 y 5% a las 14 y 22 horas PI vírica.

6.3.3 Test de Fagocitosis

El porcentaje de internalización de *H. parasuis* por parte de los PAM fue calculado como el porcentaje de células positivas contadas a través del citómetro de flujo, es decir, número de PAMs

conteniendo FITC en su interior. Todos los resultados fueron expresados en porcentaje de células con una intensidad de fluorescencia en relación a un control negativo que, para esta prueba, correspondió al tiempo 0 del tratamiento con PAM no infectados con virus. De esta manera, el citómetro de flujo expresó este porcentaje según desplazamiento de la curva de fluorescencia sobre el eje de las X, indicativo de la intensidad de fluorescencia (Figura 1). Los resultados de las pruebas Fag-Ops. 1, 2 y 3 se encuentran representados en las Figuras 2, 3 y 4. Los resultados de las pruebas Fag-No-Ops. 1 y 2 se encuentran representados en las Figuras 5 y 6. Los valores medios de estas pruebas se encuentran representados en la Figura 7 para el test de fagocitosis de bacteria opsonizada y en la Figura 8 para bacteria no opsonizada.

Los valores de fagocitosis para bacteria opsonizada fueron significativamente mayores ($p < 0.05$) que los de bacteria no opsonizada. Las diferencias entre tratamientos y tiempos PI bacteriana en caso de bacteria no opsonizada no fueron significativas ($p > 0.05$). En el test de fagocitosis con bacteria opsonizada el mayor porcentaje de células positivas a fluorescencia se detectó a los 30 minutos PI bacteriana del tratamiento de las 2 horas PI vírica, siendo significativamente más elevado que el resto de tratamientos y tiempos de inoculación bacteriana ($p < 0.05$). Para el resto de tiempos PI bacteriana no hubo diferencias entre fagocitosis de PAMs infectados o no con PRRSv ($p > 0.05$).

6.3.4 Test de Muerte Intracelular

El test de Muerte Intracelular mostró un muy elevado nivel de variabilidad entre experimentos tanto en el grupo de bacteria opsonizada como en el grupo de bacteria no opsonizada. Estos resultados se muestran en la Tabla 1 para bacteria opsonizada y en la Tabla 2 para bacteria no opsonizada.

Para todos los experimentos no hubo diferencia significativa ni entre bacteria opsonizada y no opsonizada ni entre tratamientos ni tiempos PI bacteriana ($p > 0.05$). No obstante, parece existir una tendencia indicativa de menor actividad bactericida en PAM infectados con PRRSv que en PAM no infectados con el virus. A la vez, aunque tampoco hubo diferencia significativa ($p > 0.05$), existe una tendencia en la cual se demuestra mayor actividad bactericida cuando la bacteria no es opsonizada.

Figura 1. Gráfica de intensidad de fluorescencia aportada por el citómetro de flujo. Cada curva expresa la intensidad de fluorescencia del grupo de células contadas (10.000 PAMs) en un tiempo concreto (T = tiempo en minutos PI bacteriana). El propio citómetro lee la intensidad de fluorescencia de la FITC y la convierte en un valor en porcentaje que indicaría el porcentaje final de células con FITC en su interior (o sea, PAMs que presentan bacterias en su interior y, por tanto, es una medida de la fagocitosis de estas células). En este ejemplo, la gráfica corresponde a los resultados de intensidad de fluorescencia de 2 horas PI vírica del experimento Fag-Ops. 1. Eje de las X = intensidad de fluorescencia; eje de las Y = número de células contadas para cada intensidad.

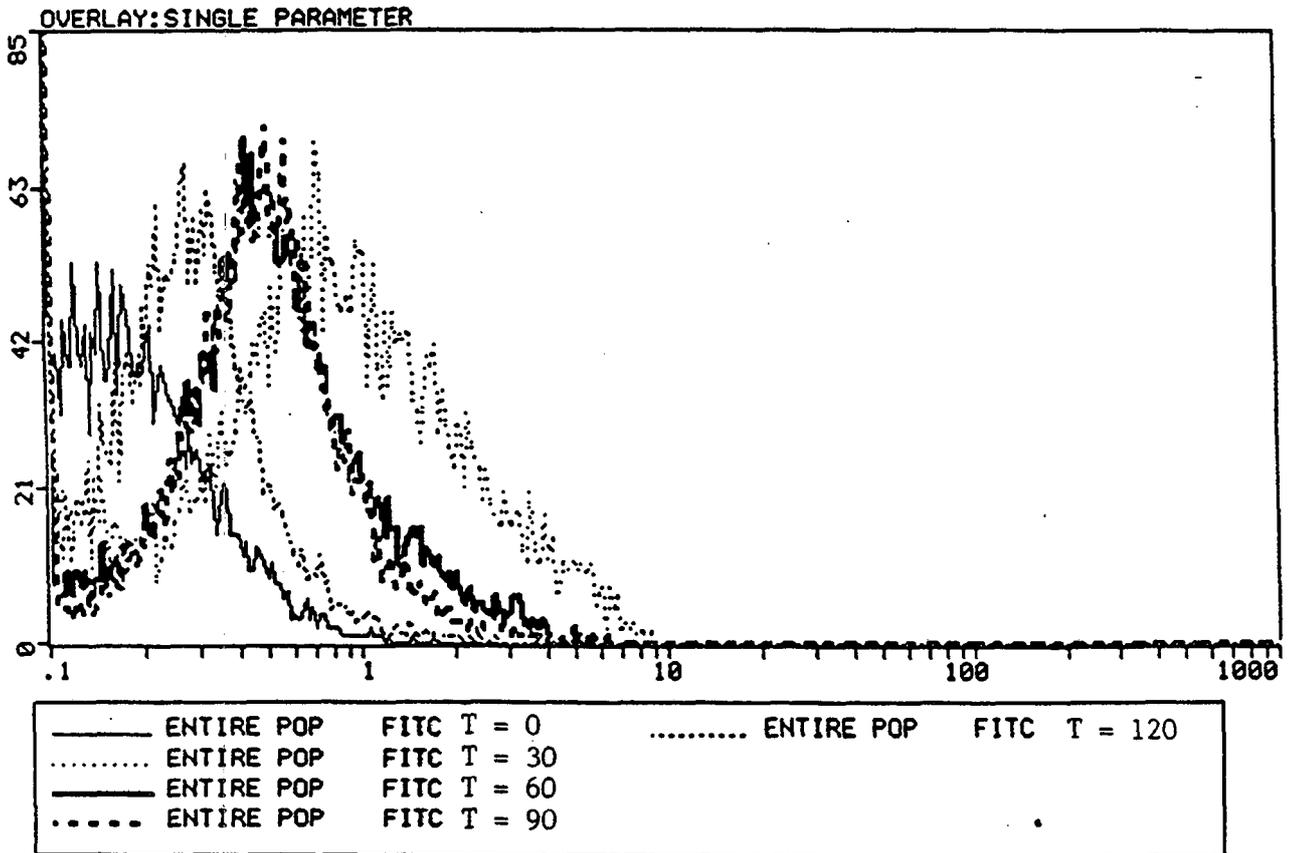


Figura 2. Prueba Fag-Ops. 1. Porcentaje de fagocitosis expresado como porcentaje de células positivas a fluorescencia entre los 0 y 120 minutos PI bacteriana por parte de PAM no infectados con PRRSv y PAM a las 2, 14 y 22 horas PI vírica.

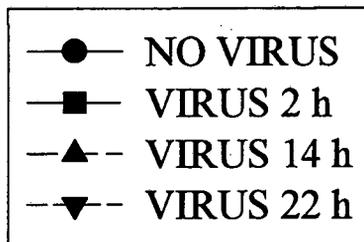
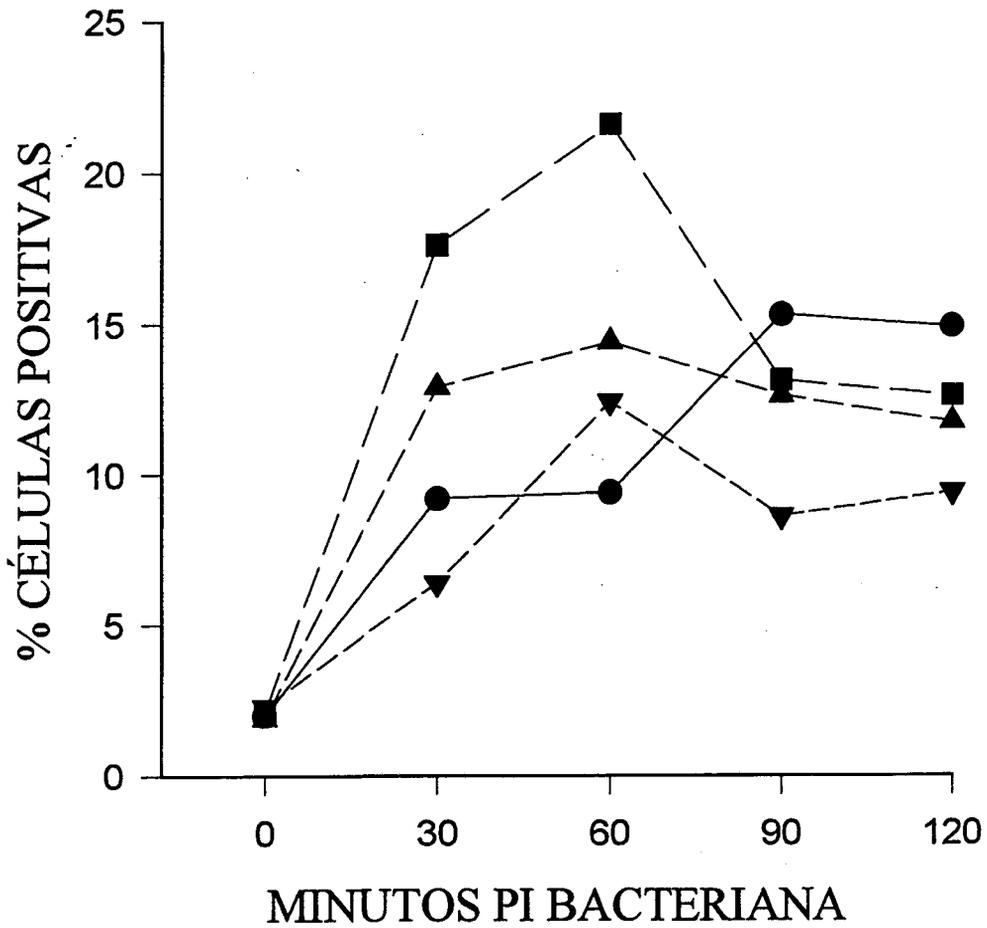


Figura 3. Prueba Fag-Ops. 2. Porcentaje de fagocitosis expresado como porcentaje de células positivas a fluorescencia entre los 0 y 120 minutos PI bacteriana por parte de PAM no infectados con PRRSv y PAM a las 2, 14 y 22 horas PI vírica.

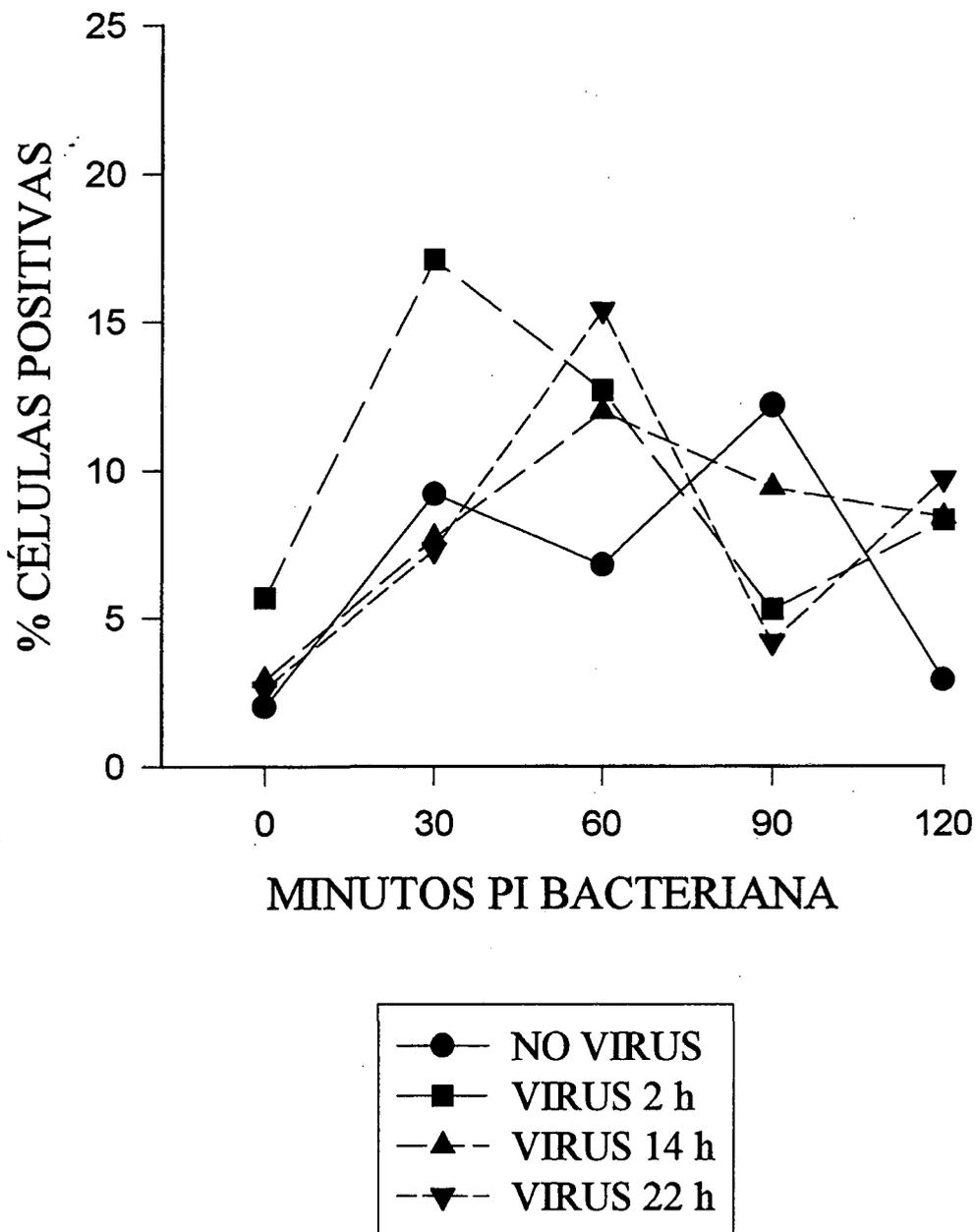


Figura 4. Prueba Fag-Ops. 3. Porcentaje de fagocitosis expresado como porcentaje de células positivas a fluorescencia entre los 0 y 120 minutos PI bacteriana por parte de PAM no infectados con PRRSv y PAM a las 2, 14 y 22 horas PI vírica.

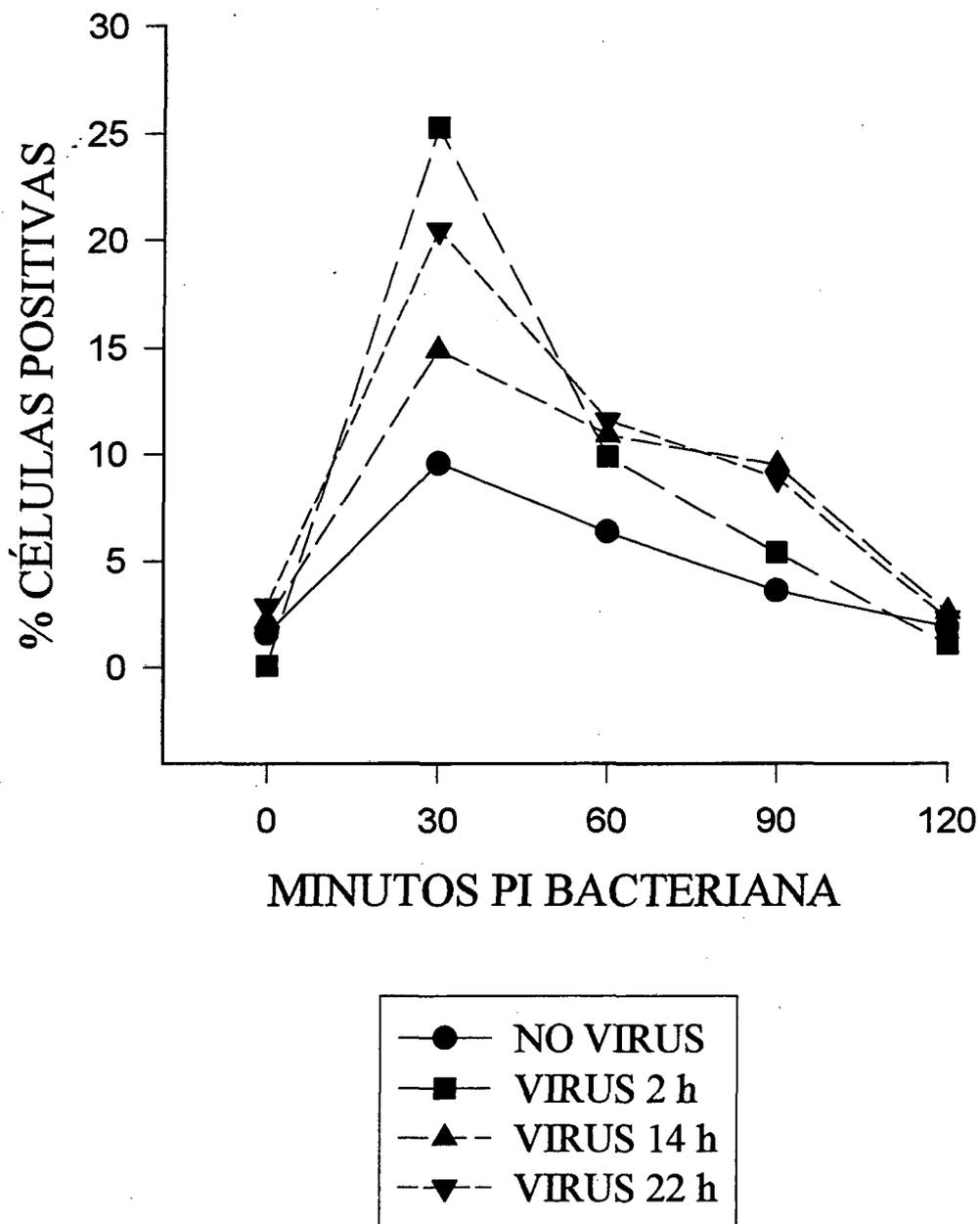


Figura 5. Prueba Fag-No-Ops. 1. Porcentaje de fagocitosis expresado como porcentaje de células positivas a fluorescencia entre los 0 y 120 minutos PI bacteriana por parte de PAM no infectados con PRRSv y PAM a las 2, 14 y 22 horas PI vírica.

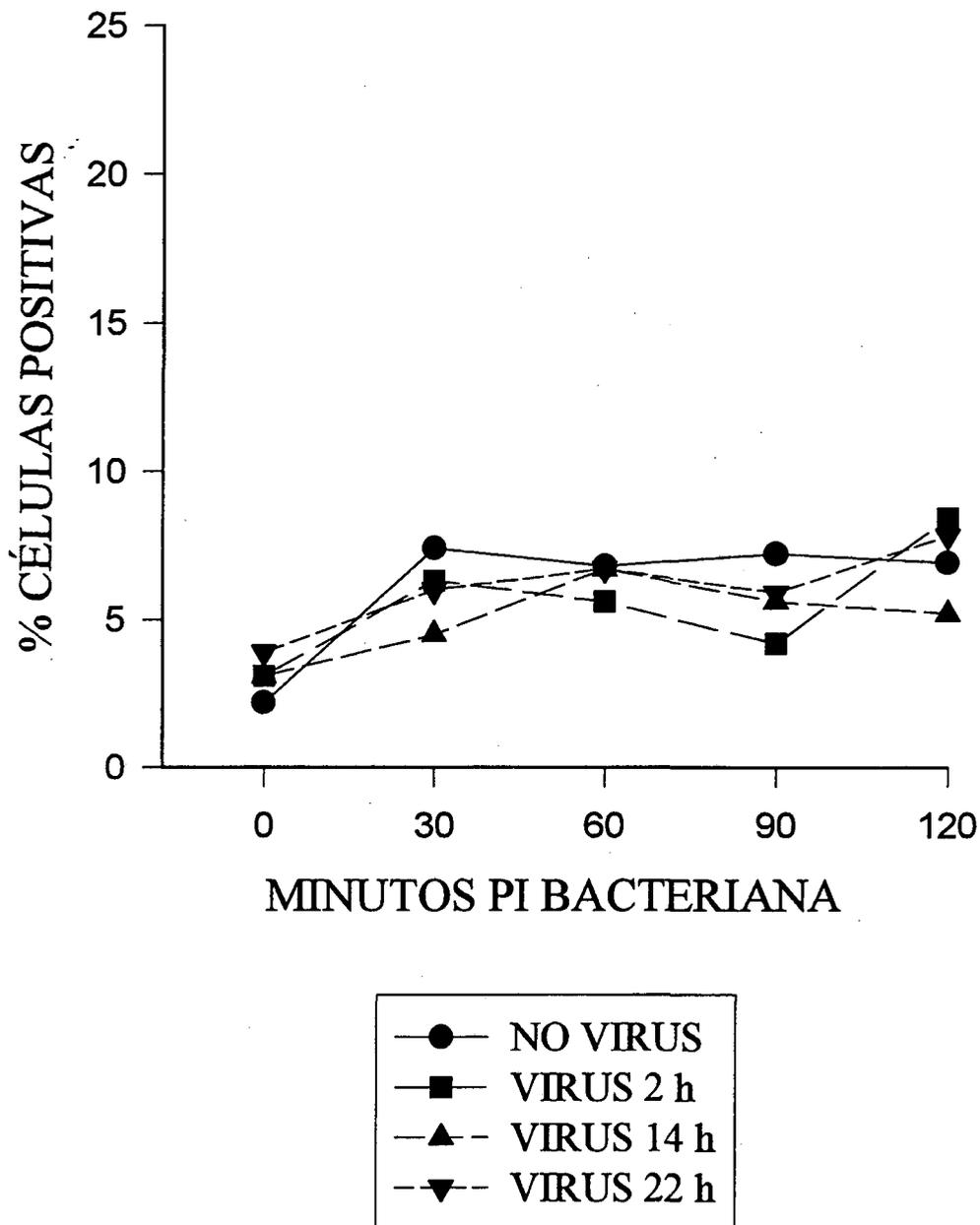


Figura 6. Prueba Fag-No-Ops. 2. Porcentaje de fagocitosis expresado como porcentaje de células positivas a fluorescencia entre los 0 y 120 minutos PI bacteriana por parte de PAM no infectados con PRRSv y PAM a las 2, 14 y 22 horas PI vírica.

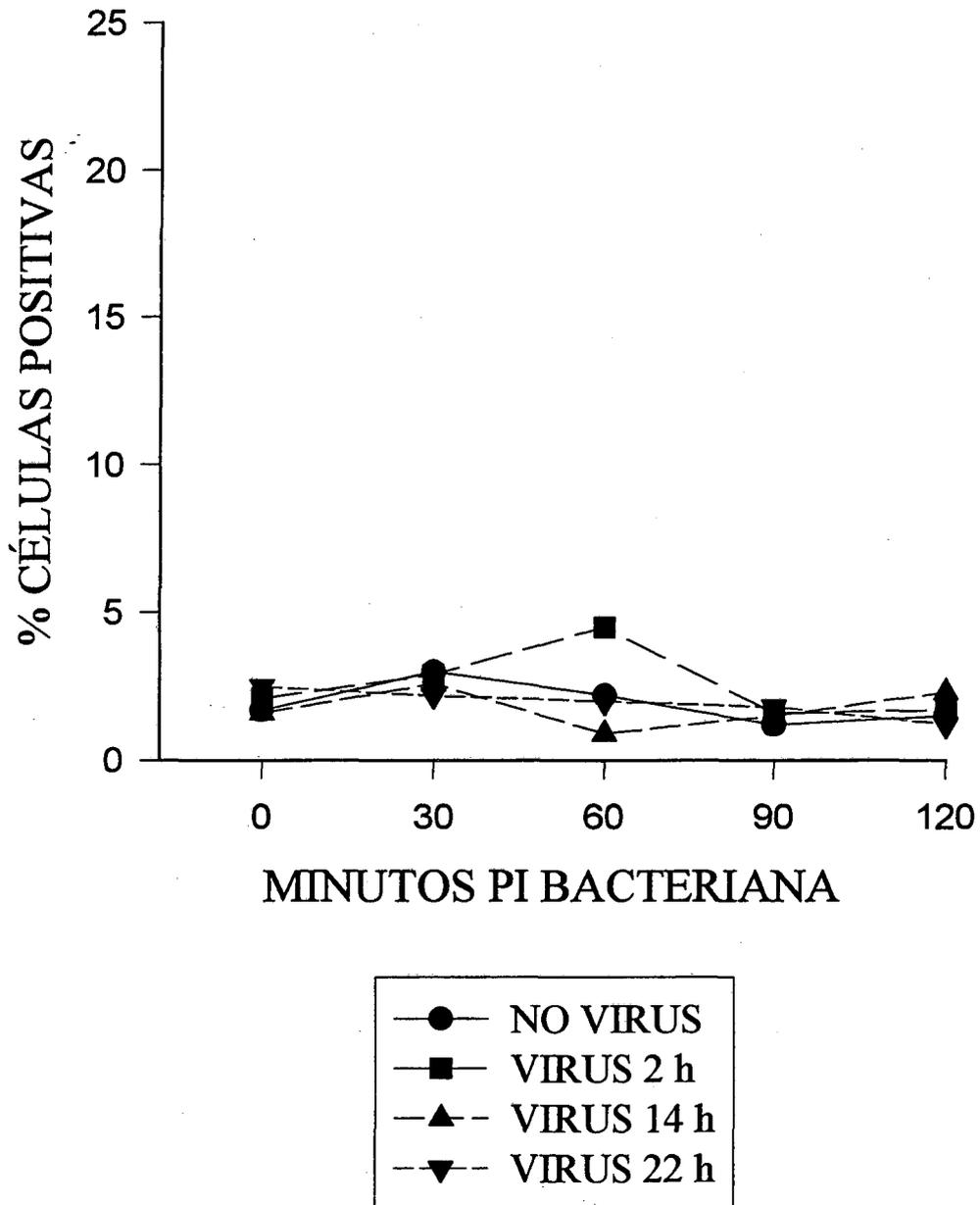


Figura 7. Valores medios de los experimentos Fag-Ops. 1, 2 y 3, con sus respectivas desviaciones típicas. Porcentaje de fagocitosis expresado como porcentaje de células positivas a fluorescencia entre los 0 y 120 minutos PI bacteriana por parte de PAM no infectados con PRRSv (A) y PAM infectados a las 2, 14 y 22 horas PI vírica (B, C y D, respectivamente).

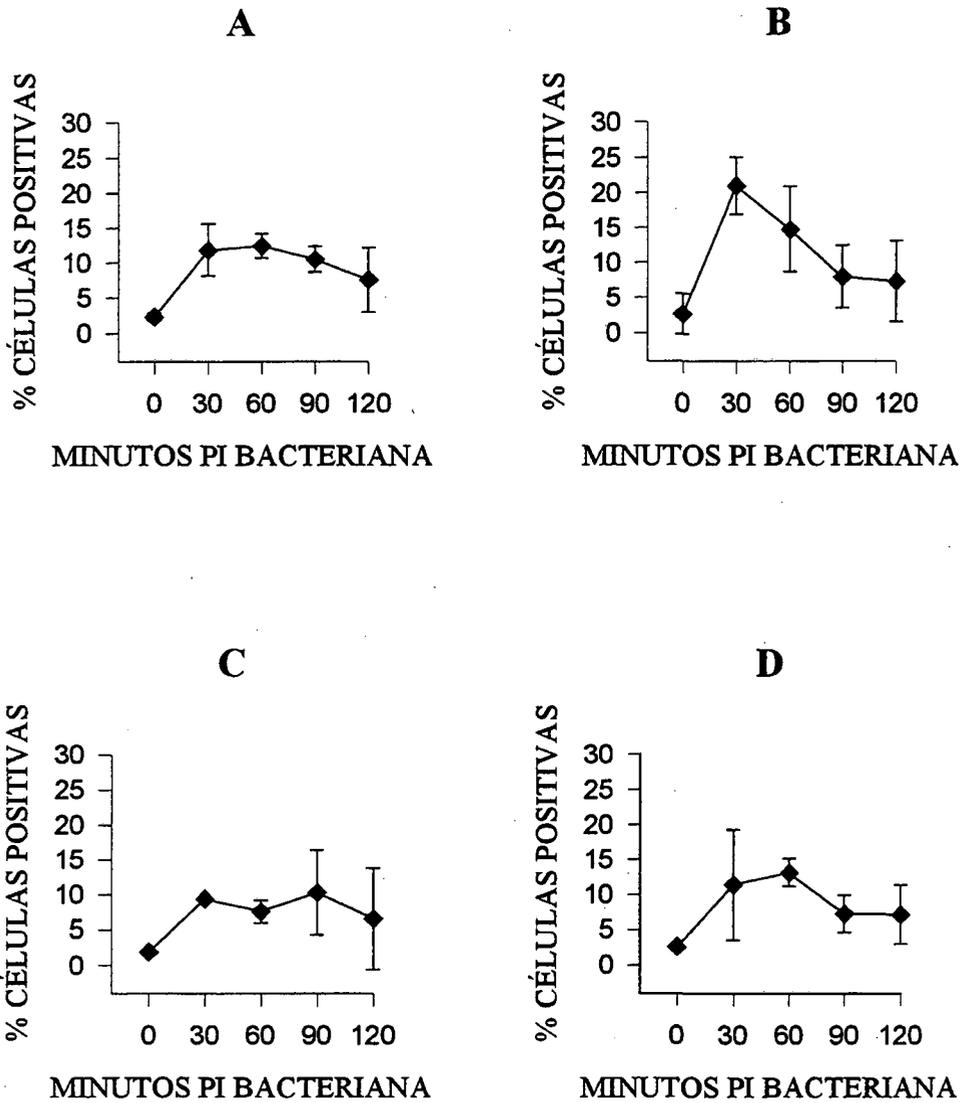


Figura 8. Valores medios de los experimentos Fag-No-Ops. 1 y 2, con sus respectivas desviaciones típicas. Porcentaje de fagocitosis expresado como porcentaje de células positivas a fluorescencia entre los 0 y 120 minutos PI bacteriana por parte de PAM no infectados con PRRSv (A) y PAM infectados a las 2, 14 y 22 horas PI vírica (B, C y D, respectivamente).

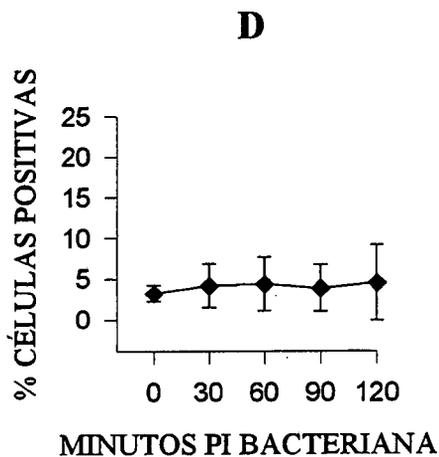
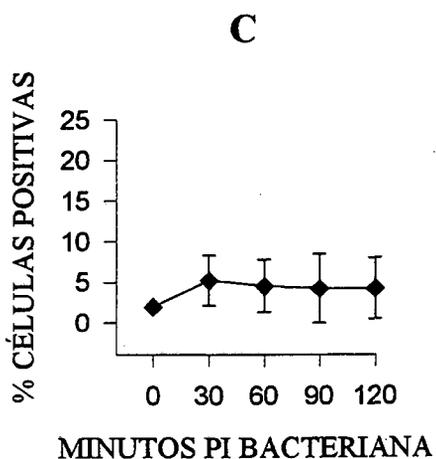
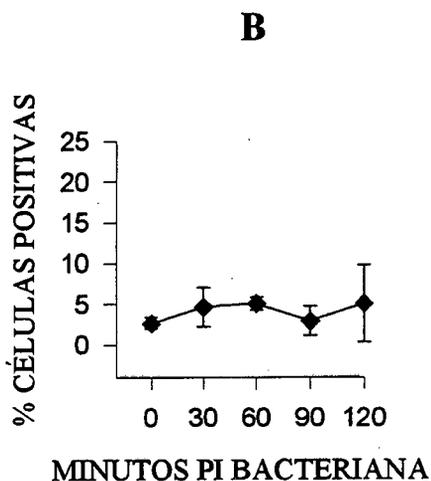
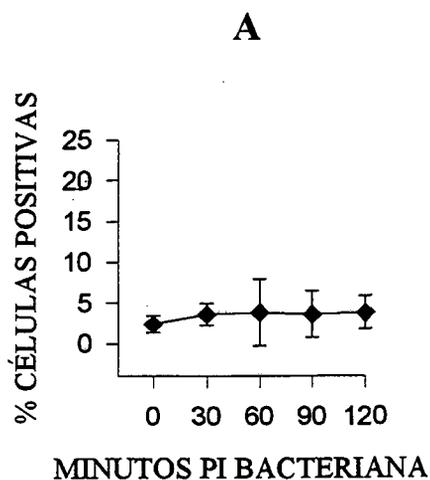


Tabla 1. Resultados de los tests de muerte intracelular (MI) 1 y 2, con bacteria opsonizada. Los valores expresan el porcentaje de *H. parasuis* muertos (con fluorescencia anaranjada) sobre el total de bacteria localizada en el interior de los PAM. Se realizó un recuento de 50 PAMs por grupo y tratamiento, mediante microscopía de fluorescencia.

Experimento de Muerte Intracelular 1 (MI-Ops. 1)				
TIEMPO (h)*	NO VIRUS	VIRUS 2h	VIRUS 14h	VIRUS 22h
1	6.32%	1.72%	1.58%	0.34%
2	14.42%	8.81%	5.93%	5.44%

Experimento de Muerte Intracelular 2 (MI-Ops. 2)				
TIEMPO (h)*	NO VIRUS	VIRUS 2h	VIRUS 14h	VIRUS 22h
1	29.61%	13.40%	17.54%	10.90%
2	7.04%	7.25%	2.68%	3.55%

Tabla 2. Resultados de los tests de muerte intracelular (MI) 1 y 2, con bacteria no opsonizada. Los valores expresan el porcentaje de *H. parasuis* muerto (con fluorescencia anaranjada) sobre el total de bacteria localizada en el interior de los PAMs. Se realizó un recuento de 50 PAM por grupo y tratamiento, mediante microscopía de fluorescencia.

Experimento de Muerte Intracelular 1 (MI-No-Ops. 1)				
TIEMPO (h)*	NO VIRUS	VIRUS 2h	VIRUS 14h	VIRUS 22h
1	6.97%	7.95%	4.60%	2.15%
2	21.55%	12.25%	14.52%	6.74%

Experimento de Muerte Intracelular 2 (MI-No-Ops. 2)				
TIEMPO (h)*	NO VIRUS	VIRUS 2h	VIRUS 14h	VIRUS 22h
1	38.08%	12.08%	27.35%	26.76%
2	14.33%	15.56%	11.74%	13.88%

Para ambas tablas:

* Tiempos de valoración de muerte intracelular a través de la prueba de OA y CV realizados posteriormente a la incubación bacteriana de 1 hora con exceso de bacteria (25 bacterias/PAM).

6.4 DISCUSIÓN

Este estudio fue realizado con el objeto de caracterizar algunos de los aspectos patogénicos observados en el estudio ultraestructural de la relación entre el PRRSV y *H. parasuis* mostrada en el capítulo 5.

En este experimento se confirma que la inoculación del PRRSV en un cultivo primario de PAM obtenidos mediante un lavado broncoalveolar en cerdos de 4-6 semanas de edad provoca la infección de estas células. No obstante, el típico efecto citopático atribuido al PRRSV (Benfield et al., 1992) no fue observado. Ello puede ser debido a distintos factores asociados al virus (dosis, cepa, pase en cultivo), a la técnica utilizada en el test (medio donde se realiza la infección) o al sistema de conteo o valoración de la prueba, aspectos ampliamente discutidos en el capítulo anterior.

La mayoría de virus de todas las especies que tienen la capacidad de replicación en macrófagos alveolares o líneas celulares derivadas de macrófagos tienen un efecto sobre la funcionalidad de estas células. Las funciones más habitualmente afectadas son la expresión de receptor Fc de la inmunoglobulinas, la liberación de citoquinas, la fagocitosis de partículas opsonizadas y no opsonizadas, el proceso de digestión post-fagocítica o muerte intracelular, la fusión de fagosoma y fagolisosoma, la liberación de radicales de oxígeno y la capacidad de adherencia a superficies (Jakab, 1982; Babiuk et al., 1988; Galina, 1995).

La fagocitosis de *H. parasuis* opsonizada por parte de PAM se encontró alterada por la infección de éstos con el PRRSV. Concretamente, se obtuvieron mayores porcentajes de fagocitosis bacteriana en los grupos infectados con virus respecto a los grupos controles, aunque este aumento solo es significativo a las 2 horas PI vírica. En este tratamiento y, específicamente, a los 30 minutos PI bacteriana fue cuando se consiguió un máximo porcentaje de fagocitosis de *H. parasuis* que, en la media de los experimentos, se situó en el 21% (indicación de que el 21% de las células respecto el control a 0 minutos PI bacteriana para ese tiempo PI vírica son positivas, es decir, presentan bacteria fluorescente en su interior). Aunque no hay diferencia estadísticamente significativa, también se apreció que existe un aumento de fagocitosis para todos los grupos de infección vírica respecto el grupo control a los 60 minutos PI bacteriana.

Estos resultados sugieren que el PRRSv tiene un efecto sobre los PAM de aumento de fagocitosis, al menos con *H. parasuis* y entre los 30 y 60 minutos PI bacteriana. Este efecto ya fue observado en las investigaciones de interacción *in vitro* entre el PRRSv y *Streptococcus suis* tipo II (Galina, 1994; Galina et al., 1994). El diseño experimental en los dos estudios permite establecer una comparación de resultados casi del 100% dado que el tipo de metodología utilizado es común en las dos investigaciones. En el caso de *S. suis*, los PAM a 22 horas PI vírica presentaban un mayor porcentaje de fagocitosis de bacteria opsonizada, coincidiendo entre los 60 y 90 minutos PI bacteriana, logrando unos niveles hasta del 50% de fagocitosis.

No obstante, se observan una serie de diferencias claras, tal como es el porcentaje de fagocitosis, mucho mayor en el caso de *S. suis*, y el tiempo PI vírica en el cual se da esta mayor fagocitosis. En cuanto al primer aspecto, este podría relacionarse con el tipo de bacteria: *S. suis* es un microorganismo gram positivo mientras que *H. parasuis* es gram negativo y, en términos generales, los AM tienen mayor capacidad de fagocitosis de microorganismos gram positivos que negativos (Green y Kass, 1964; Horwitz, 1982). La razón por la cual el mayor nivel de fagocitosis de *H. parasuis* se produce a las 2 horas PI vírica mientras que para *S. suis* se produce a las 22 horas es desconocida. De todas maneras, en los estudios de fagocitosis de *S. suis* se concluyó que el efecto observado a las 22 horas podía ser un artificio ya que a esos tiempos de infección vírica se había dado un nivel considerable de destrucción de PAM (Galina, 1994). Este hecho no sucedió en este estudio a tenor de los resultados de microscopía electrónica.

Este efecto de aumento de fagocitosis por parte de AM también se ha observado para otros virus y otras especies. Concretamente ha sido observado para el Virus Respiratorio Sincitial Bovino (BRSV) (Olchowky et al., 1994), Virus de la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBRV) (Bielefeldt-Ohmann y Babiuk, 1986) y Virus Herpes Simplex (Plaeger-Marshall et al., 1983). En los tres casos se observa un aumento de la fagocitosis en las primeras horas del test para experimentos realizados *in vitro* (IBRV y virus Herpes Simplex) y en los primeros días PI vírica en caso de extracción de AM de terneros inoculados con el virus *in vivo* (BRSV). No obstante, el patrón de comportamiento de los AM es variable según cepa de virus utilizada, tipo de partícula a fagocitar y diseño experimental realizado.

La realización *in vivo* o *in vitro* de la infección vírica para el diseño experimental de fagocitosis tiene gran importancia en cuanto a los resultados de porcentaje de fagocitosis. Por ejemplo, es cierto que la fagocitosis de partículas opsonizadas por parte de AM infectados con BRSV *in vivo* se encuentra aumentada inicialmente, pero en caso de partículas no opsonizadas se encuentra disminuida, y cuando el experimento se realiza con infección vírica *in vitro* no se observa variación entre fagocitosis de grupos tratados con virus y grupos control (Trigo et al., 1985; Olchoway et al., 1994). De forma casi contraria ocurre con el IBRV, ya que mientras *in vitro* si se observa este aumento de fagocitosis, experimentos realizados con infección vírica *in vivo* no muestran variación de la fagocitosis entre grupos tratados con virus y grupos control (Forman y Babiuk, 1982; Forman et al., 1982; Bielefeldt-Ohmann y Babiuk, 1986).

La cepa vírica utilizada también es un elemento clave en cuanto a los resultados de fagocitosis. Se han observado diferencias entre cepas de un mismo virus en los casos de infección de AM *in vitro* con Adenovirus Bovino (Adair et al., 1992), PPV (Harding y Molitor, 1988) y ADV (Iglesias et al., 1989). En estos casos suele existir una relación directamente proporcional entre virus de baja patogenicidad y niveles de fagocitosis muy cercanos a los obtenidos por AM sin infectar con virus.

Las diferencias en fagocitosis también son evidentes según el tipo de partícula o bacteria utilizada en el test de fagocitosis. Este fenómeno ha sido descrito en caso de BRSV (Trigo et al., 1985), Virus de la Parainfluenza 1 de los ratones (Virus Sendai) (Jakab y Warr, 1981) y IBRV (Forman y Babiuk, 1982).

No obstante, uno de los aspectos más sorprendentes de los resultados del test de fagocitosis es el bajo porcentaje de fagocitosis. Ello está en relación a los resultados obtenidos en el capítulo 5, en el cual, a través de la observación en microscopía electrónica, se observaron niveles de fagocitosis cercanos al 50-70%. La explicación de este fenómeno puede ser debido, probablemente, a la utilización de dos pruebas con un método de contaje totalmente diferente, dado que los resultados de fagocitosis de bacterias publicados en la literatura sugieren que existe una clara variabilidad asociada a la metodología utilizada (Wright, 1986; Perry y Martin, 1995).

Desde hace 30 años se vienen desarrollando distintos métodos cuantitativos de medida de la actividad fagocítica. Estos incluyen la visualización directa por microscopio óptico, observación por

microscopía electrónica, conteo por espectrofluorimetría y conteo por citómetro de flujo (Stewart et al., 1986; Wright, 1986; Harvath y Terle, 1994). Todas estas técnicas presentan una serie de ventajas e inconvenientes, pero en los últimos años y, probablemente, por la facilidad de realización y la capacidad de contar un elevado número de células por tratamiento, se ha tendido a desarrollar métodos que utilizan el citómetro de flujo (Vray et al., 1980; Bassoe y Solberg, 1984; Drevets y Campbell, 1991; Plasman y Vray, 1994; Jouin et al., 1995).

Al utilizar el citómetro de flujo en los tests de fagocitosis, es necesario marcar al producto a fagocitar con un fluorocromo. De esta manera, una vez realizados los lavados de las células fagocíticas después de realizar el test de fagocitosis, solo quedará marcaje fluorescente en el interior de estas células (elementos fagocitados) y en su superficie (elementos adheridos). Para diferenciar unos de otros existen sustancias capaces de quelar la fluorescencia extracelular, de manera que la lectura de la prueba a la longitud de onda adecuada al fluorocromo utilizado solo detectará a aquellos elementos que se encuentren intracelularmente. Al quelar la fluorescencia extracelular, ésta cambia de longitud de onda y no es leída por el citómetro de flujo (Drevets y Campbell, 1991).

El análisis por citómetro de flujo aporta información en cuanto a la intensidad de fluorescencia relativa. A partir de este dato, el aparato calcula automáticamente el porcentaje de células fagocíticas fluorescentes. Se trata de un método de elevada sensibilidad dado que permite detectar la presencia de una sola partícula fluorescente por macrófago (Plasman y Vray, 1994).

En los experimentos realizados, uno de los problemas existentes podría haber sido la calibración del control negativo que, para cada tratamiento, fue la muestra con tiempo de 0 minutos PI bacteriana sin infección vírica. No obstante, la realización de la prueba en tubo significaba que para cada tratamiento del procesado eran necesarios tres lavados previos. Ello supone que la adición de fijador a la muestra (momento inequívoco de paro del proceso de fagocitosis) se realizaba después de unos 15 minutos desde la adición de la bacteria marcada con fluoresceína. Aunque previamente se había añadido PBS a 4°C con el objeto de frenar esta fagocitosis, el paro no fue instantáneo. De esta manera, el porcentaje 0 de calibración al citómetro de flujo probablemente suponía la eliminación de cierto porcentaje de fagocitosis que, al compararlo con el siguiente tiempo (30 minutos PI bacteriana), este sería comparativamente mucho menor, y más teniendo en cuenta que la mayor parte de fagocitosis de *H. parasuis* a través de la valoración con microscopía electrónica se realizó

en los primeros 30 minutos. Ello explicaría que los resultados del test de fagocitosis y los ultraestructurales mostrasen porcentajes de ingestión de bacteria bastante desiguales, aunque se mantuviera en ambos casos un máximo de fagocitosis en lo que correspondería a tiempo de 30 minutos PI bacteriana.

No obstante, se observa que a las 2 horas PI vírica y a los 30 minutos PI bacteriana se produce el máximo porcentaje de fagocitosis por parte de los PAM, independientemente del sistema de valoración utilizado. La razón por la cual el sistema de microscopía electrónica aporta unos resultados no distintos significativamente entre ellos y el test de fagocitosis si, es desconocida. Probablemente la respuesta se encuentre en que la microscopía electrónica realiza una observación directa de bacterias intracehulares, mientras que a través del citómetro de flujo se aporta un valor en porcentaje equivalente a la intensidad de fluorescencia de todo el grupo de células contadas (Plasman y Vray, 1994), de manera que es una medida indirecta de fagocitosis.

Con independencia de los métodos de valoración, y basándonos en las condiciones experimentales diseñadas para los experimentos de microscopía electrónica y de funcionalidad, parece que el PRRSv ejerce un efecto de estimulación *in vitro* de los PAM en las fases iniciales de la infección, y, aunque este efecto también ha sido detectado en otros virus mencionados anteriormente, el mecanismo por el cual se da este fenómeno es desconocido. Una posible explicación de este efecto incluye la posibilidad de que el PRRSv tenga una actividad de inducción de receptores Fc sobre los PAM. Este fenómeno fue descrito inicialmente en la infección de cultivos celulares de fibroblastos humanos por Herpes Simplex Virus (Watkins, 1964). En este estudio se observó que fibroblastos infectados con el virus tenían la capacidad de adsorber eritrocitos de oveja previamente opsonizados, mientras que este fenómeno no se daba en fibroblastos no infectados. Posteriormente este efecto fue también demostrado en fibroblastos humanos infectados con Citomegalovirus (Furukawa et al., 1975; Rahman et al., 1976) y se postuló la posibilidad de que estos receptores para Fc fueran glicoproteínas codificadas por el genoma vírico y se expresaran en caso de infección, o bien se diese la síntesis de receptor como resultado de una estimulación o desrepresión del genoma de la célula huésped que bajo condiciones normales no se producía (Keller et al., 1976; Westmoreland et al., 1976). Posteriormente se estudió la naturaleza de la glicoproteína receptora de Fc generada en cultivos celulares de riñón de mono infectados por Herpes Simplex y se postuló que el origen de esta proteína probablemente era vírica (Baucke y Spear, 1979). A través de marcajes

por inmunomicroscopía electrónica se pudo determinar que esta glicoproteína receptora de Fc formaba parte de la superficie del virión, además de la membrana de las células infectadas (Para et al., 1980). Por esta razón, los resultados de aumento de fagocitosis en las primeras horas por parte de AM de conejo infectados previamente con el virus Herpes Simplex fueron sugestivos del efecto de aumento de receptores Fc (Plaeger-Marshall et al., 1983). No obstante, este efecto no se ha detectado en el Virus de la Lactato Deshidrogenasa, género representativo de la recientemente creada familia Arteriviridae, en la cual se incluiría el PRRSv (Isakov et al., 1982; Plagemann y Moenning, 1992). De hecho, este efecto se ha descrito básicamente en virus representantes de la familia Herpesviridae (Furukawa et al., 1975; Baucke y Spear, 1979; Para et al., 1980)

Paralelamente, a través de los experimentos realizados, queda claro que la fagocitosis de *H. parasuis* no opsonizada no se produce o bien se produce mínimamente, independientemente de la presencia de infección vírica o no. Estos resultados sugieren que el PRRSv no tiene efecto sobre la fagocitosis no mediada por anticuerpos realizada por PAM. Este efecto ya ha sido descrito para otros virus que afectan al ganado porcino, concretamente el Virus de la Enfermedad de Aujeszky (Iglesias et al., 1989), aunque este último si tiene un efecto de depresión de la fagocitosis en caso de partículas opsonizadas.

A la vez, estos resultados de partícula no opsonizada apoyan la hipótesis de que la ausencia de inmunidad humoral contra *H. parasuis* puede ser el factor principal por el cual la bacteria produzca enfermedad en cerdos (Nielsen y Danielson, 1975).

Los resultados del test de muerte intracelular para *H. parasuis* fueron bastante dispares según experimento realizado. Los resultados muestran una tendencia de mayor capacidad de digestión post-fagocítica en los grupos control respecto de los infectados, y dentro de estos últimos, mayor capacidad de muerte intracelular cuanto menor sea el tiempo PI vírica. Este efecto de disminución de digestión post-fagocítica ha sido ampliamente descrito en el caso de otros virus que se multiplican en AM. Concretamente es un efecto demostrado en caso de BRSV, Adenovirus Bovino, Virus de la Influenza A del ratón, Virus de la Parainfluenza 3 Bovina, Virus de la Peste Porcina Clásica (PPC), PPV y ADV (Warshauer et al., 1977; Pijoan et al., 1980; Hesse y Toth, 1983; Fuentes y Pijoan, 1986; Harding y Molitor, 1988; Adair et al., 1992; Olchoway et al., 1994). La razón de este efecto se ha relacionado en algunos casos con la capacidad del virus de impedir

total o parcialmente el proceso de fusión de lisosoma y fagosoma (Pijoan et al., 1980; Fuentes y Pijoan, 1986; Adair et al., 1992; Olchowky et al., 1994). No obstante, a falta de pruebas directas de detección de esta actividad a nivel funcional, los resultados ultraestructurales del capítulo anterior sugieren que este no es un efecto causado por el PRRSv. De hecho, a nivel ultraestructural, a los 90 minutos PI bacteriana se observó una gran cantidad de fagolisosomas en degeneración, lo que indica una notable capacidad de digestión por parte de PAM. Asimismo el número de PAM con presencia de bacterias sin digerir fue relativamente bajo comparado con los resultados a 30 minutos PI bacteriana. El menor porcentaje de este tipo de PAM se dió en el grupo control, hecho que apoya los resultados del test de muerte intracelular, en los cuales esta actividad es mayor en PAMs no infectados con PRRSv.

Los resultados de digestión post-fagocítica realizados con PAM infectados con PRRSv sobre *S. suis* tipo II muestran que el virus tiene un efecto estimulante sobre la digestión post-fagocítica, siendo especialmente marcado en PAMs 14 horas PI vírica, es decir, las cepas virulentas de *S. suis* se multiplican con mayor facilidad en macrófagos no infectados con el virus (Galina, 1994; Galina et al., 1994). Estos resultados no son refrendados por los obtenidos para *H. parasuis*. En este caso, parece que el PRRSv facilita un aumento de la supervivencia de la bacteria a medida que aumenta el tiempo PI vírico. No obstante, no hay uniformidad en cuanto a la evolución de muerte intracelular en el tiempo, dado que el experimento 1 tanto con bacteria opsonizada como no opsonizada el aumento del tiempo supone un aumento de este parámetro, mientras que en el experimento 2 se observa una disminución. El distinto comportamiento de *S. suis* respecto *H. parasuis* probablemente radica en la capacidad mostrada por la primera bacteria de multiplicarse en el interior de PAM.

El mecanismo por el cual el efecto del virus implica esta disminución de la capacidad de muerte intracelular es desconocido. No obstante, el efecto causado por la infección *in vivo* a los 7 días PI del PRRSv sobre las células procedentes de lavados broncoalveolares implica una disminución en la producción de NADPH-oxidasa y anión superóxido (Zhou et al., 1992), de manera que este hecho podría relacionarse con el efecto de disminución de la digestión post-fagocítica por parte de los PAM.

En cuanto a la variabilidad de los valores observados en los experimentos del test de muerte intracelular, ello podría ser debido a la reconocida disparidad funcional de PAM que puede ser hallada entre distintas proporciones de subpoblaciones macrofágicas (Choi et al., 1995), la distinta capacidad de infección del PRRSv según cual sea el animal de origen de los PAM (Van Reeth y Pensaert, 1995) y a que ésta fue una técnica inicialmente concebida para *S. suis*, bacteria gram positiva y de multiplicación intracelular (Williams, 1990), y no para una bacteria gram negativa como *H. parasuis*.

La existencia de distintas subpoblaciones macrofágicas puede ser uno de los factores más importantes que expliquen la variabilidad en el comportamiento *in vivo* e *in vitro* de los PAM frente a distintos agentes infecciosos. La hipótesis más aceptada sobre la existencia de subpoblaciones de macrófagos alveolares consiste en que éstas reflejan un cambio de funciones contínuo inducido por maduración celular y por respuesta a antígenos exógenos. De hecho, se han establecido 5 fracciones distintas a través de un gradiente de Percoll y entre ellas destaca una variación del aspecto morfológico, de la capacidad de fagocitosis, de la expresión del receptor de la Fc de inmunoglobulinas, de la producción de anión superóxido y del factor de necrosis tumoral (TNF) y de la susceptibilidad a la replicación a PRRSv (Choi et al., 1996). Esto implicaría una variabilidad de estas subpoblaciones dependiendo de factores como la propia granja y el propio individuo.

En resumen, y en las condiciones experimentales expuestas en este estudio, parece ser que el PRRSv tiene un efecto *in vitro* de mejora de la fagocitosis de *H. parasuis* en las primeras horas PI pero por el contrario tiene un efecto de depresión de digestión post-fagocítica que aumenta con el tiempo PI vírica. Este efecto local a nivel de PAM no permitiría explicar los resultados obtenidos *in vivo*, dado que, en teoría, funciones tan importantes como la digestión post-fagocítica de bacterias se encuentra disminuida y debería facilitar de esta manera el trasvase de bacteria a sangre. No obstante, la disminución de esta función no es muy marcada respecto a PAM no infectados y podría ser que un posible efecto de mejora de inmunidad sistémica descrito en infecciones por el PRRSv (Molitor et al., 1992; Molitor, 1993) fuera el que marcara la diferenciación de resultados patológicos entre los grupos infectados con virus y bacteria y los infectados solo con bacteria en condiciones *in vivo*, más que un efecto a nivel de PAMs.

6.5 BIBLIOGRAFÍA

ADAIR, B.M.; McNULTY, M.S.; FOSTER, J.C.

Effects of two adenoviruses (type 1 and type 8) on functional properties of bovine alveolar macrophages *in vitro*.
Am. J. Vet. Res., 53 (6): 1010-1014, 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.

BASSOE, C.F.; SOLBERG, C.O.

Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by human leukocytes: quantitation by a flow cytometric and a microbiological method.
Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand., Sect. C, 92: 43-50, 1984.

BAUCKE, R.B.; SPEAR, P.G.

Membrane proteins specified by Herpes Simplex virus. V. Identification of an Fc-binding glycoprotein.
J. Virol., 32 (3): 779-789, 1979.

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, 1992.

BIELEFELDT-OHMANN, H.; BABIUK, L.A.

Alteration of alveolar macrophage functions after aerosol infection with bovine herpesvirus type-1.
Infect. Immunity, 51 (1): 344-347, 1986.

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., aceptado, 1996.

DREVETS, D.A.; CAMPBELL, P.A.

Macrophage phagocytosis: use of fluorescence microscopy to distinguish between extracellular and intracellular bacteria.
J. Immunol. Methods, 142: 31-38, 1991.

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.

CARVALHO, L.F.; SEGALÉS, J.; PIJOAN, C.

Effect of PRRSv on subsequent *Pasteurella multocida* challenge in pigs.
Proc. II International Symposium on PRRS, Clinical Picture and Pathogenesis, 20, 1995.

COOPER, V.L.; DOSTER, A.R.; HESSE, R.A.; HARRIS, N.B.

Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome: NEB-1 PRRSV infection did not potentiate bacterial pathogens.
J. Vet. Diagn. Invest., 7 (3): 313-320, 1995.

FORMAN, A.J.; BABIUK, L.A.

Effect of infectious bovine rhinotracheitis virus infection on bovine alveolar macrophage function.
Infect. Immunity, 35 (3): 1041-1047, 1982.

- FORMAN, A.J.; BABIUK, L.A.; BALDWIN, F.; FRIEND, C.E.
Effect of infectious bovine rhinotracheitis virus infection of calves on cell populations recovered by lung lavage.
Am. J. Vet. Res., 43 (7): 1174-1179, 1982.
- FURUKAWA, T.; HORNBERGER, E.; SAKUMA, S.; PLOTKIN, S.A.
Demonstration of immunoglobulin G receptors induced by human cytomegalovirus.
J. Clin. Microbiol., 2 (4): 332-336.
- 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, Thailand, 142, 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.
- GOYAL, S.M.
Porcine reproductive and respiratory syndrome.
J. Vet. Diagn. Invest., 5: 656-664, 1995.
- GREEN, G.M.; KASS, E.H.
The role of the alveolar macrophage in the clearance of bacteria from the lung.
J. Exp. Med., 119: 167-176, 1964.
- HARDING, M.J.; MOLITOR, T.W.
Porcine parvovirus: replication in and inhibition of selected cellular functions of swine alveolar macrophages and peripheral blood lymphocytes.
Arch. Virol., 101: 105-117, 1988.
- HARVATH, L.; TERLE, D.A.
Assay for phagocytosis. En: Methods in molecular biology, Vol. 34: Immunocytochemical methods and protocols. Javois Ed., 249-259, 1994.
- HESSE, R.A.; TOTH, T.E.
Effects of bovine parainfluenza-3 virus on phagocytosis and phagosome-lysosomes fusion of cultured bovine alveolar macrophages.
Am. J. Vet. Res., 44 (10): 1901-1907, 1983.
- HORWITZ, M.A.
Phagocytosis of microorganisms.
Rev. Infect. Dis., 4 (1): 104-123, 1982.
- IGLESIAS, G.; PIJOAN, C.; MOLITOR, T.
Interactions of Pseudorabies virus with swine alveolar macrophages I: virus replication.
Arch. Virol., 104: 107-115, 1989.
- ISAKOW, N.; FELDMAN, M.; SEGAL, S.
Lactic dehydrogenase virus (LDV) impairs antigen-presenting capacity of macrophages yet fails to affect their phagocytic activity.
Immunobiology, 162: 15-27, 1982.

- 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.
- JOUIN, H.; GOGUET DE LA SALMONIERE, Y.O.; BEHR, C.; HUYIN QAN DAT, M.; MICHEL, J.C.; SARTHOU, J.L.; PEREIRA DA SILVA, L.; DUBOIS, P.
Flow cytometry detection of surface antigens on fresh, unfixed red blood cells infected by *Plasmodium falciparum*.
J. Immunol. Methods, 179: 1-12, 1995.
- KELLER, R.; PEITCHEL, R.; GOLDMAN, J.N.; GOLDMAN, M.
An Ig G-Fc receptor induced in cytomegalovirus-infected human fibroblasts.
J. Immunol., 116 (3): 772-777, 1976.
- 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.
- 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.
- OLCHOWY, T.W.J.; AMES, T.R.; MOLITOR, T.W.
Interaction of bovine Respiratory Syncytial virus with bovine alveolar macrophages *in vivo*: effects of virus infection upon selected cell functions.
Can. J. Vet. Res., 58: 42-48, 1994.
- PARA, M.F.; BAUCKE, R.B.; SPEAR, P.G.
Immunoglobulin G (Fc)-binding receptors on virions of Herpes Simplex virus type 1 and transfer of these receptors to the cell surface by infection.
J. Virol., 34 (2): 512-520, 1980.
- PERRY, D.G.; MARTIN, W.J.
Fluorescent liposomes as quantitative markers of phagocytosis by alveolar macrophages.
J. Immunol. Methods, 181: 269-285, 1995.
- 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.
- PLAEGER-MARSHALL, S.; WILSON, L.A.; SMITH, J.W.
Alteration of rabbit alveolar and peritoneal macrophage function by Herpes Simplex virus.
Infect. Immunity, 41 (3): 1376-1379, 1983.
- PLAGEMANN, P.G.W.; MOENNING, V.
Lactate dehydrogenase-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.

- PLASMAN, N.; VRAY, B.
Quantification of bacterial phagocytosis by flow cytometry and spectrofluorometry.
J. Immunol. Methods, 174: 195-202, 1994.
- POL, J.M.A.; VAN LEENGOED, L.; STOCKHOFE, N.; WENSVOORT, G.
Dual infections of PRRS/Influenza or PRRS/APP in the respiratory tract.
Proc. II International Symposium on PRRS, Clinical picture and pathogenesis, 22, 1995.
- RAHMAN, A.A.; TESCHNER, M.; SETHI, K.K.; BRANDIS, H.
Appearance of Ig G (Fc) receptor(s) on cultured human fibroblasts infected with human cytomegalovirus.
J. Immunol., 117 (1): 253-258, 1976.
- STEWART, C.C.; LEHNERT, B.E.; STEINKAMP, J.A.
In vitro and *in vivo* measurement of phagocytosis by flow cytometry.
Methods Enzymol., 132: 183-192, 1986.
- TRIGO, E.; LIGGITT, H.D.; EVERMANN, J.F.; BREEZE, R.G.; HUSTON, L.Y.; SILFLOW, R.
Effect of *in vitro* inoculation of bovine Respiratory Syncytial virus on bovine pulmonary alveolar macrophage function.
Am. J. Vet. Res., 46 (5): 1098-1103, 1985.
- VAN REETH, K.; PENZAERT, M.
Pathogenesis and clinical manifestations of respiratory PRRSv infection.
Proc. II International Symposium on PRRS, Clinical picture and pathogenesis, 18, 1995.
- VRAY, B.; HOEBEKE, J.; SAINT-GUILLAN, M.; LELOUP, R.; STROSBERG, A.D.
A new quantitative fluorimetric assay for phagocytosis of bacteria.
Scand. J. Immunol., 11: 147-153, 1980.
- 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.
- WATKINS, J.F.
Adsorption of sensitized sheep erythrocyte to HeLa cells infected with Herpes Simplex virus.
Nature, 202: 1364-1365, 1964.
- WESTMORELAND, D.; JEOR, S.S.; RAPP, F.
The development by cytomegalovirus-infected cells of binding affinity for normal human immunoglobulin.
J. Immunol., 116 (6): 1566-1570, 1976.
- WILLIAMS, A.E.
Relationship between intracellular survival in macrophages and pathogenicity of *Streptococcus suis* type 2 isolates.
Micro. Pathogen., 8: 189-196, 1990.
- WRIGHT, S.D.
Methods for the study of receptor mediated phagocytosis.
Methods Enzymol., 132: 204-221, 1986.
- 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, 1992.

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.

CAPÍTULO 7:
CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La inoculación intratraqueal de *H. parasuis* (serovar 5) 5 días PI vírica con el PRRSv en animales convencionales libres de PRRSv y *H. parasuis* no resultó en un incremento en el nivel de presentación de poliserositis fibrinosa respecto los animales inoculados únicamente con bacteria.
2. En las condiciones experimentales mencionadas se observó que el PRRSv tiene un efecto doble sobre la infección por *H. parasuis* que se caracterizó por un menor número de animales afectados de poliserositis fibrinosa pero una mayor mortalidad debida a un proceso de shock séptico.
3. La inoculación intranasal del PRRSv en animales libres de PRRS con sacrificio a los 7 y 13 días PI vírica resulta en la infección de éstos. La detección de antígeno vírico en los tejidos de estos animales fue escasa, siendo pulmón, corazón y tonsila los órganos con mayor cantidad de éste.
4. La inoculación intratraqueal y intranasal de *H. parasuis* resulta en enfermedad de Glässer básicamente en animales que se encuentran libres de esta bacteria.
5. En los casos de infección con *H. parasuis*, el antígeno se distribuye en distintas serosas, libre o en el interior de células fagocíticas, y pulmón. En casos de muerte por shock séptico la bacteria se encuentra en la mayoría de órganos, siendo el bazo y los vasos sanguíneos del hígado y del corazón las localizaciones más frecuentes.
6. La inoculación del PRRSv en cultivo de PAM resulta en un bajo porcentaje de células infectadas; los cambios ultraestructurales observados hasta las 48 horas PI con una dosis de inoculación vírica de 1 MOI consisten en un aumento del número de lisosomas y, en mucho menor grado, de fagosomas y fagolisosomas.
7. Una vez los PAM, infectados o no con PRRSv, han fagocitado *H. parasuis* opsonizado, la digestión y eliminación de esta bacteria se realiza con gran eficacia.

8. Los PAM infectados o no con PRRSv, tienen una capacidad media-baja de fagocitosis de *H. parasuis* opsonizada, pero prácticamente nula de *H. parasuis* no opsonizada.
9. A las 2 horas PI vírica con PRRSv y 30 minutos PI bacteriana con *H. parasuis* se observa el máximo nivel de fagocitosis de la bacteria, llegando a un nivel medio del 25% de células con bacteria en su interior a través de su cálculo mediante citómetro de flujo.
10. La infección de PAM con el PRRSv parece tener un efecto de menor capacidad de muerte intracelular de *H. parasuis* opsonizada a medida que aumenta el tiempo PI vírico.