

**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA**

**DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA**



**TESIS DOCTORAL**

**ESTUDIO INMUNOHISTOPATOLÓGICO  
DE LA PESTE PORCINA AFRICANA EXPERIMENTAL  
(AISLADO E75) EN CERDOS MINIATURA**

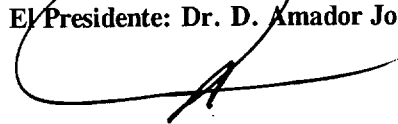
**FRANCISCO RODRÍGUEZ GUIADO**

Las Palmas de Gran Canaria, 1994

38/1993-94  
UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA  
UNIDAD DE TERCER CICLO Y POSTGRADO

Reunido el día de la fecha, el Tribunal nombrado por el Excmo. Sr. Rector Magfco. de esta Universidad, el aspirante expuso esta TESIS DOCTORAL.

Terminada la lectura y contestadas por el Doctorando las objeciones formuladas por los señores jueces del Tribunal, éste calificó dicho trabajo con la nota de APTO CUM LAUDE por unanimidad Las Palmas de G. C., a 10 de Junio de 1.994.  
El Presidente: Dr. D. Amador Jover Moyano,



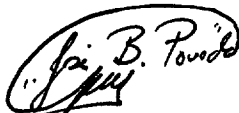
El Secretario: Dr. D. Anselmo Gracia Molina,



El Vocal: Dr. D. José-Manuel Sánchez-Vizcaíno Rodríguez,



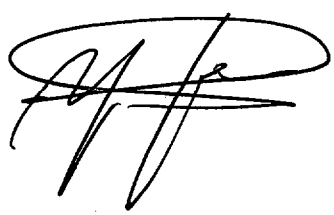
El Vocal: Dr. D. José Bismarck Poveda-Guerrero,



El Vocal: Dr. D. Ignacio Casal Alvarez,



El Doctorando: D. Francisco Rodríguez Guisado,





**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA**

**"ESTUDIO INMUNOHISTOPATOLÓGICO DE LA PESTE PORCINA  
AFRICANA EXPERIMENTAL (AISLADO E75) EN CERDOS  
MINIATURA"**

**FRANCISCO RODRÍGUEZ GUIADO**  
Las Palmas de Gran Canaria, 1994.

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
LAS PALMAS DE G. CANARIA
Nº Documento.....339.817
Nº Copia.....339.839



**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

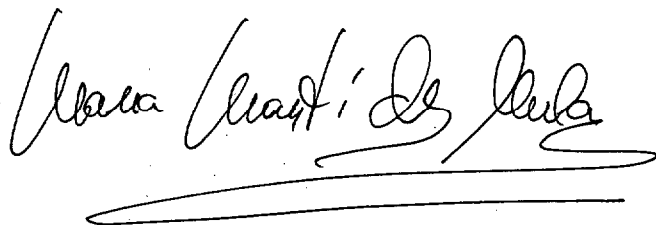
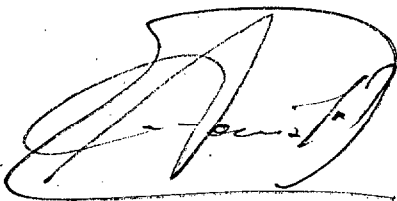
**DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA**

**"ESTUDIO INMUNOHISTOPATOLÓGICO DE LA PESTE PORCINA  
AFRICANA EXPERIMENTAL (AISLADO E75) EN CERDOS  
MINIATURA"**

Tesis Doctoral presentada por D. Francisco  
Rodríguez Guisado para optar al grado de  
Doctor en Veterinaria.



**LOS DIRECTORES**



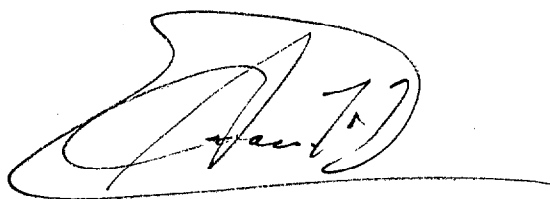
**Dr. D. Antonio Fernández Rodríguez. Dra. Dña. Juana Martín de las Mulas González-Albo.**

**ANTONIO J. FERNÁNDEZ RODRÍGUEZ, CATEDRÁTICO DEL ÁREA DE  
CONOCIMIENTO DE "ANATOMÍA Y ANATOMÍA PATOLÓGICA COMPARADAS"  
DEL DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE  
LA U.L.P.G.C.**

**INFORMA:**

Que **D. FRANCISCO RODRÍGUEZ GUIADO**, Licenciado en Veterinaria, ha realizado bajo mi dirección y asesoramiento el presente trabajo titulado **"ESTUDIO INMUNOHISTOPATOLÓGICO DE LA PESTE PORCINA AFRICANA EXPERIMENTAL (AISLADO E75) EN CERDOS MINIATURA"**, el cual considero que reúne las condiciones y calidad científica para su presentación por el interesado para optar al grado de Doctor en Veterinaria.

Las Palmas de Gran Canaria, 25 de Marzo de 1993.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Antonio J. Fernández Rodríguez', enclosed within a large, stylized, circular flourish.

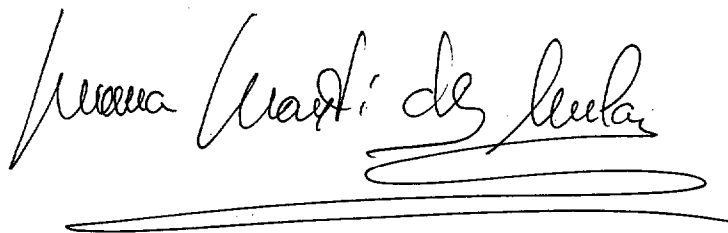
Fdo. Antonio J. Fernández Rodríguez.

**JUANA MARTÍN DE LAS MULAS GONZÁLEZ-ALBO, PROFESORA TITULAR DEL  
DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y ANATOMÍA PATOLÓGICA COMPARADAS DE  
LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD DE CORDOBA**

**INFORMA:**

Que **D. FRANCISCO RODRÍGUEZ GUIADO**, Licenciado en Veterinaria, ha realizado bajo mi dirección y asesoramiento el presente trabajo titulado "**ESTUDIO INMUNOHISTOPATOLÓGICO DE LA PESTE PORCINA AFRICANA EXPERIMENTAL (AISLADO E75) EN CERDOS MINIATURA**", el cual considero que reúne las condiciones y calidad científica para su presentación por el interesado para optar al grado de Doctor en Veterinaria.

Las Palmas de Gran Canaria, 25 de Marzo de 1993.

A handwritten signature in black ink, reading "Juana Martín de las Mulas". The signature is written in a cursive style and is underlined with a thick, dark line.

Fdo. Juana Martín de las Mulas González-Albo.

**A MIS PADRES  
A MIS HERMANOS  
A ROSA MARIA**



# ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>5</b>
<b>II.1. ETIOLOGÍA .....</b>	<b>6</b>
<b>II.2. ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE         A LAS PROTEÍNAS DEL VPPA .....</b>	<b>11</b>
<b>II.3. EPIZOOTIOLOGÍA Y PATOGENIA DE LA PPA .....</b>	<b>13</b>
II.3.1. Datos Epidemiológicos .....	13
II.3.2. Patogenia de la PPA .....	15
<b>II.4. MECANISMOS PATOGENICOS DE LAS HEMORRAGIAS         EN LA PPA .....</b>	<b>20</b>
II.4.1. Trombocitopenia .....	20
II.4.2. Reducción de los factores de la coagulación .....	22
II.4.3. Coagulación Intravascular Diseminada .....	22
II.4.4. Lesión Vascular/Disfunción Endotelial .....	23
II.4.5. Activación de leucocitos .....	24
<b>II.5. PATOLOGÍA DE LA PPA .....</b>	<b>25</b>
II.5.1. Tonsilas .....	25
II.5.2. Ganglios Linfáticos .....	26
II.5.3. Bazo .....	28
II.5.4. Médula Ósea .....	30
II.5.5. Hígado .....	32
II.5.6. Pulmón .....	37
II.5.7. Riñón .....	40
<b>II.6. INMUNOLOGÍA DE LA PPA .....</b>	<b>43</b>

---

<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>51</b>
<b>II.1. MATERIAL</b> .....	<b>52</b>
III.1.1. Animales .....	52
III.1.2. Obtención de las muestras de órganos .....	54
III.1.3. Obtención de las muestras de sangre .....	54
III.1.4. Reactivos de Inmunohistoquímica .....	55
<b>III.2. MÉTODOS</b> .....	<b>56</b>
III.2.1. Estudio Estructural .....	56
III.2.2. Estudio Inmunohistoquímico .....	56
III.2.2.1. Pretratamientos .....	57
III.2.2.2. Demostración de la Proteína Vf3 PV73 .....	58
III.2.2.3. Demostración de IgM, IgG e IgA Porcinos .....	60
III.2.2.4. Demostración de queratinas en el epitelio de las Tonsilas .....	61
III.2.2.5. Determinación de antígenos relacionados con el Factor VIII de la coagulación .61	
III.2.3. Estudio Hematológico	
III.2.3.1. Recuento de hematíes y leucocitos .....	62
III.2.3.2. Recuento de plaquetas .....	62
III.2.3.3. Estudio virológico y serológico .....	62
<b>IV. RESULTADOS</b> .....	<b>63</b>
<b>IV.1. ESTUDIO ESTRUCTURAL</b> .....	<b>64</b>
<b>IV.2. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO</b> .....	<b>81</b>
IV.2.1. Distribución de la PV73 .....	81
IV.2.2. Distribución tisular de IgM, IgG e IgA porcinos .....	93
<b>IV.3. ESTUDIO HEMATOLÓGICO</b> .....	<b>103</b>

---

<b>V. ICONOGRAFÍA .....</b>	<b>108</b>
<b>VI. DISCUSIÓN .....</b>	<b>132</b>
VI.1. TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS EMPLEADAS .....	133
VI.2. PATOLOGÍA DE LA PPA .....	139
VI.3. MECANISMOS PATOGENICOS DE LAS HEMORRAGIAS EN LA PPA .....	150
<b>VII. CONCLUSIONES .....</b>	<b>155</b>
<b>VIII. RESUMEN .....</b>	<b>158</b>
<b>IX. SUMMARY .....</b>	<b>161</b>
<b>X. AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>164</b>
<b>XI. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>166</b>

---

# I. INTRODUCCIÓN

La Peste Porcina Africana (PPA) es una enfermedad producida por un deoxivirus que afecta a cerdos domésticos y salvajes. Desde la descripción de la enfermedad en África en 1921, donde permanece endémica, se extendió en 1960 a Portugal y posteriormente a España. A pesar de los intensos esfuerzos para su erradicación, la enfermedad permanece también endémica en algunas zonas de la Península Ibérica. Durante los últimos 30 años se han producido focos epizooticos en diferentes países de Europa y América con importantes pérdidas económicas, por lo que se continua trabajando en diferentes métodos de control y erradicación, ya que hasta el momento no se ha logrado obtener una vacuna eficaz.

La investigación en España en PPA se realiza en el Centro de Investigación en Sanidad Animal de Valdeolmos (INIA, Madrid), en el Centro de Biología Molecular (CBM) y en la Facultad de Veterinaria de Córdoba. Este último grupo desarrolla su trabajo sobre la Patología de las distintas formas de la enfermedad y así, se está llevando a cabo la Fase IV (1992-1995) sobre el estudio ultraestructural e inmunohistológico en los animales infectados con los aislados E75, Malawi y República Dominicana del VPPA.

Los estudios inmunohistológicos proporcionan importantes datos etiopatogénicos en las enfermedades infecciosas. En la PPA estos estudios han sido realizados en un principio utilizando cortes de tejidos fijados por congelación y mediante técnicas de inmunofluorescencia. En los

---

últimos años se han desarrollado técnicas de inmunoperoxidasa sobre tejidos incluidos en parafina con los que se adquiere un mejor detalle morfológico que en la actualidad nos permite obtener un mayor número de datos al poder emplear anticuerpos monoclonales. Hasta el momento, los anticuerpos monoclonales desarrollados contra el VPPA han sido utilizados preferentemente en el diagnóstico serológico, no encontrándose en la literatura su uso en estudios inmunohistológicos.

La principal característica lesional de las formas aguda y subaguda de la PPA son las hemorragias en numerosos órganos y serosas de los animales. En la actualidad, algunos grupos de investigación están estudiando la patogenia de estas hemorragias encontrando la participación de mecanismos derivados de la acción directa y/o indirecta del virus sobre distintos tipos celulares implicados e interrelacionados en la respuesta inmune, inflamatoria y en la coagulación sanguínea.

En estudios previos se ha comprobado que las células blanco primarias del virus de la PPA son las pertenecientes al Sistema Mononuclear Fagocítico (SMF) siendo los órganos ricos en estas células, los de mayor interés en el diagnóstico virológico y en el estudio lesional de la enfermedad. Por otra parte, en los últimos años se han obtenido datos tanto "in vivo" como "in vitro" que demuestran que el VPPA puede replicar, aunque en escasa proporción, en otras células no pertenecientes al SMF.

Uno de los fenómenos más característico de la PPA es la coexistencia de una viremia con altos títulos de anticuerpos anti-virus siendo éstos, no protectores "in vivo". Igualmente se ha comprobado tanto "in vitro" como "in vivo" el importante papel de las inmunoglobulinas y el complemento en el desarrollo de procesos inmunopatológicos en la enfermedad. En estudios llevados a cabo en cerdos inoculados experimentalmente con los aislados altamente virulento (E70) y moderadamente virulento (E75), se apuntó el papel de las inmunoglobulinas y el complemento en las lesiones pulmonares y hepáticas en la PPA. Sobre la base de estos y otros estudios se establecieron los principales objetivos de la presente tesis doctoral:

1.- Demostración de la proteína mayoritaria de la cápside viral (PV73) mediante el empleo de un anticuerpo monoclonal (18B.G3) y la utilización de técnicas inmunohistológicas sobre tejidos fijados o refijados en formol e incluidos rutinariamente en parafina.

2.- Distribución de la PV73 en tejidos de cerdos miniatura infectados experimentalmente con el aislado viral España 75 (E75).

3.- Estudio inmunohistopatológico de las lesiones inducidas por el aislado moderadamente virulento E75 en cerdos miniatura.

4.- Distribución de inmunoglobulinas (IgM, IgG e IgA) en diferentes tejidos de cerdos infectados experimentalmente con el VPPA (E75) utilizando anticuerpos monoclonales.



## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

## II.1. ETIOLOGÍA.

La Peste Porcina Africana (PPA) es una enfermedad vírica que afecta exclusivamente a animales de la Familia Suidae (Hess, 1971; Wardley y cols., 1983; Viñuela, 1985) siendo considerada como una de las patologías más complejas e importantes del cerdo doméstico (Plowright, 1980; Hess, 1987b; Wilkinson, 1989; Canals y cols., 1992; Sánchez-Vizcaíno 1992; Arias y cols., 1993).

El Virus de la Peste Porcina Africana (VPPA) es un deoxivirus citoplasmático de simetría icosaédrica (Plowright y cols., 1966; Almeida y cols., 1967; Enjuanes y cols., 1976b; Carrascosa y cols., 1984) clasificado provisionalmente en base a criterios morfológicos dentro de la Familia Iridoviridae (Hess, 1971; Wildy, 1971; Kelly y Robertson, 1973; Fenner, 1976; Goorha y Granoff, 1979; Matthews, 1982; Carrascosa y cols., 1984; Brown, 1986). Sin embargo, este virus presenta algunas características estructurales de organización del genoma y de la síntesis de ARNm similares a los poxvirus (Kuznar y cols., 1980; Kuznar y cols., 1981; Salas y cols., 1981; Salas y cols., 1983; Wardely y cols., 1983; Sogo y cols., 1984; Viñuela, 1985; Salas y cols., 1988; Bournsnell y cols., 1991).

El microscopio electrónico de transmisión muestra el VPPA con formas hexagonales o pentagonales (Haag y cols., 1966; Moura Nunes y cols., 1980; Carrascosa y cols., 1984),

---

mediando las partículas víricas extracelulares entre 175 y 215 nm dependiendo de que éstas presenten o no envoltura externa (Breese y DeBoer, 1966a; Haag y cols., 1966; Breese y DeBoer, 1967; García-Gancedo y cols., 1974b; Moura Nunes y cols., 1975; Enjuanes y cols., 1976b; Carrascosa y cols., 1984). El virus maduro está formado por una nucleoide central electrodenso donde se encuentra el material genético envuelto por una membrana lipídica electrolúcida; externamente se encuentra la cápside de morfología hexagonal rodeada a su vez por una membrana lipoproteica (Almeida y cols., 1967; Breese y DeBoer, 1967; Hess, 1971; Wardley y cols., 1983; Viñuela, 1985). El virus extracelular presenta adicionalmente una envuelta externa, adquirida al salir por gemación a través de la membrana de la célula infectada, envuelta que no parece afectar a la capacidad infectiva del virus (Moura Nunes y cols., 1975; Carrascosa y cols., 1984).

El genoma del virus de la PPA es una molécula de ADN lineal de doble cadena y aproximadamente 170 Kpb con un contenido de GC del 41% (Adlinger y cols., 1966; Enjuanes y cols., 1976b; Almendral y cols., 1984). Algunos estudios apoyan la hipótesis de que el ADN viral es sintetizado en el núcleo y posteriormente transportado al citoplasma celular (Ortín y Viñuela, 1977; Tabarés y Sánchez Botija, 1979; Sanz y cols., 1985; Carrascosa y cols., 1986) mientras que otros trabajos parecen indicar que la replicación tiene lugar en el citoplasma celular, cerca del núcleo, en las denominadas factorías virales o cuerpos de inclusión (Vigario y cols., 1967; Pan y cols., 1980; Galo y Nunes Petisca, 1990). En cualquier caso, la síntesis del ADN requiere de una ADN polimerasa inducida por el virus que no se incorpora a la partícula viral (Polatnick y Hess, 1972) y que a su vez necesita del núcleo funcional de la célula infectada (Ortín y Viñuela, 1977). Para realizar los estudios sobre la estructura y organización del genoma viral, éste se ha clonado en su mayor parte en plásmidos y fagos (Ley y cols., 1984; Hingamp y cols., 1992), obteniéndose mapas de restricción del virus mediante el empleo de distintas endonucleasas de restricción (Ley y cols., 1984; Almendral y cols., 1985; Dixon, 1988).

Los extremos del ADN viral se encuentran unidos covalentemente (Ortín y cols., 1979; Almendral y cols., 1984) con repeticiones terminales e internas invertidas (Sogo y cols., 1984). La unión covalente entre las dos cadenas tiene lugar mediante una estructura en horquilla de 37 nucleótidos compuesta casi exclusivamente por Adenina y Timina (González y cols., 1986). Próxima a los extremos se encuentra la repetición invertida terminal constituida por varias series

de repeticiones directas dispuestas en tándem y separadas por zonas de secuencia única. Los estudios realizados con diferentes aislados víricos muestran variaciones significativas en esta región (Blasco y cols., 1989a; Blasco y cols., 1989b). Adyacentes a esta región, hacia el interior del genoma, se encuentran otras repeticiones directas que dan lugar a la existencia de dos familias multigénicas (360 y 110I) (Almendral y cols., 1990; González y cols., 1990). Las familias multigénicas poseen fases de lectura abierta que producen proteínas ligeramente distintas, pero muy relacionadas. Asimismo, estas zonas presentan una gran variabilidad entre distintos aislados naturales las cuales consisten en deleciones o adiciones (Viñuela, 1985; Tabarés, 1987b; Agüero y cols., 1990), lo que podría indicar que estas zonas se encuentran relacionadas con la variabilidad antigénica del virus, constituyendo un posible mecanismo de escape del virus frente al sistema inmune (Blasco y cols., 1989a). En el centro de la molécula se encuentra la región más constante en todos los aislados (Blasco y cols., 1989a).

La obtención de los mapas de restricción del ADN viral ha permitido también realizar un análisis sobre la variabilidad genética de los distintos aislados (Wesley y Pan, 1982; Dixon, 1988; Blasco y cols., 1989b; Agüero y cols., 1990). Así, mediante el análisis con enzimas de restricción los aislados víricos Europeos y Americanos muestran estrechas relaciones (Wesley y Pan, 1984; Viñuela, 1985; Blasco y cols., 1989a); en contraste con los aislados de virus Africanos que manifiestan importantes diferencias entre ellos y con los aislados Europeos (Wesley y Pan, 1984; Blasco y cols., 1989a). Esto sugiere el origen común así como la proximidad de los virus aislados fuera del continente africano (Blasco y cols., 1989a).

De igual manera y mediante enzimas de restricción se han secuenciado algunos genes de las proteínas mayoritarias del virus; como la PV73 (López-Otín y cols., 1990), la PV37 (López-Otín y cols., 1988) y algunas enzimas del virus (Hingamp y cols., 1992).

#### Proteínas del virus.

En los últimos años, diferentes grupos de investigación han realizado numerosos estudios para conocer la composición proteica estructural y no estructural del VPPA. Los resultados de estos trabajos han mostrado algunas diferencias en relación al peso molecular y al número de proteínas estructurales y de infección entre los distintos aislados virales (Black y Brown, 1976;

Vigario y cols., 1977; Tabarés y cols., 1983a).

### *Proteínas estructurales.*

El aislado E70 del VPPA adaptado a cultivos celulares y purificado mediante centrifugación en gradientes de sacarosa, evidenció 28 proteínas estructurales con pesos moleculares comprendidos entre 11.5 y 243 KD (Carrascosa y cols., 1978; Tabarés y cols., 1980), siendo las proteínas mayoritarias del virus intracelular la PV172, PV73, PV46, PV42, PV36, PV12 y la PV15 (Tabarés y cols., 1980; Wardley y cols., 1983; Tabarés, 1987a); de ellas el polipéptido PV42 parece corresponderse con la actina celular (Tabarés y cols., 1980; Esteves y cols., 1986). Además, entre las proteínas estructurales se han caracterizado fosfoproteínas (Tabarés y cols., 1983), glicoproteínas (Tabarés y cols., 1980; Tabarés y cols., 1983; Del Val y cols., 1986;) y proteínas surgidas a partir de precursores por actividades proteásicas (Sanz y cols., 1985; López-Otín y cols., 1988; López-Otín y cols., 1989).

Mediante el empleo de otros métodos como la solubilización de proteínas con detergentes (Tabarés y cols., 1980) y la inmunomicroscopía electrónica utilizando anticuerpos monoclonales frente a proteínas virales (Carrascosa y cols., 1986; Carrascosa y cols., 1993) se ha logrado determinar la distribución de algunas proteínas estructurales del virus. A diferencia del virus intracelular, en el virus extracelular adaptado a células Vero se han identificado 34 proteínas estructurales con pesos moleculares comprendidos entre 10 y 150 KD (Carrascosa y cols., 1985). Entre ellas, se ha caracterizado una proteína estructural de 12 KD que se piensa que corresponde al receptor vírico específico de membrana (Carrascosa y cols., 1993).

### *Proteínas de infección.*

Mediante el uso de técnicas de electroforesis convencional se han descrito 44 proteínas inducidas en células MS infectadas con el VPPA, cuyos pesos moleculares oscilan entre 9.5 y 243 KD (Escribano y cols., 1987b). Empleando la electroforesis bidimensional se han identificado 95 proteínas del virus Badajoz 71 (Santarén y Viñuela, 1986), 106 inducidas por el aislado Lisboa 60 (Esteves y cols., 1986) y 111 proteínas de infección en el VPPA (E70) (Urzainqui y cols., 1987).

El empleo de inhibidores específicos de la síntesis de proteínas y del ADN vírico, ha demostrado la existencia de una regulación en la síntesis de proteínas de infección las cuales son expresadas de forma temprana y tardía (Esteves y cols., 1986; Santarén y Viñuela, 1986; Escribano y Tabarés, 1987b; Tabarés, 1987a; Urzainqui y cols., 1987), encontrándose en el último grupo una de las proteínas estructurales mayoritarias del virus, la PV73 (Escribano y Tabarés, 1987b; Tabarés, 1987a).

### *Proteínas antigénicas.*

Se han logrado caracterizar numerosas proteínas (entre 25 y 55) inductoras de anticuerpos en los cerdos infectados (Tabarés, 1987a; Alcaraz y cols., 1992). Una de ellas, la proteína estructural tardía y mayoritaria PV73 ha sido purificada (Tabarés y cols., 1981) y utilizada como reactivo antigénico en la técnica de ELISA (Sánchez-Vizcaíno y cols., 1982; Takamatsu y cols., 1987) e Immunodot blot (Geering y cols., 1986). Igualmente, otras proteínas con pesos moleculares entre 23 y 35 KD han sido utilizadas en inmunoblotting al observarse que éstas inducen anticuerpos en fases más tempranas que la proteína estructural mayoritaria PV73, lo que contribuye a mejorar el diagnóstico serológico de la PPA (Pastor y cols., 1990).

En base a la importancia de las glicoproteínas virales en los mecanismo inmunitarios de neutralización, se han identificado siete polipéptidos glicosilados del VPPA intracelular, tres de los cuales son precipitados por sueros procedentes de animales infectados (Tabarés y cols., 1983). Sin embargo en el virus extracelular purificado no se ha comprobado la existencia de tales glicoproteínas (Del Val y cols., 1986).

Otras proteínas de interés desde el punto de vista de la protección son las que se expresan en la membrana de la célula infectada, al poder estar implicadas en los mecanismos de citotoxicidad dependiente de anticuerpos y mediada por linfocitos y/o complemento (Norley y Wardley, 1982; Norley y Wadley, 1983a; Norley y Wardley, 1983b; Norley y Wardley, 1984; Wardley y cols., 1985). En este caso, las proteínas de mayor interés serían las de expresión temprana ya que bloquearían la producción de viriones al provocar la lisis celular antes de completarse el ciclo de replicación vírica (Escribano y cols., 1987a; Camacho y Viñuela, 1991). Con este objetivo y en células Vero se han demostrado las proteínas de infección con pesos

moleculares de 220 KD (Santarén y Viñuela, 1986), de 32 KD (Whyard y cols., 1985; Santarén y Viñuela, 1986) y de 12 KD (Revilla y cols., 1988), así como la proteína estructural 22 KD (Camacho y Viñuela, 1991) que se expresan en la membrana de las células infectadas, si bien no se ha demostrado su participación en la inducción de una respuesta inmune específica.

Otros trabajos han identificado hasta 12 proteínas virales antigénicas asociadas a los macrófagos infectados (Alcaraz y cols., 1989; Alcaraz y cols., 1992). De éstas, tres (PV16, PV15 y PV14) son reconocidas por sueros homólogos, pero no por sueros de cerdos que no han tenido contacto con el virus o con aislados heterólogos, lo que indica que estas proteínas podrían jugar un papel importante en los mecanismos de resistencia frente al virus (Alcaraz y cols., 1989).

## II.2. ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A PROTEÍNAS DEL VPPA.

La tecnología de los anticuerpos monoclonales, descubierta por Köhler y Milstein en 1975, permite obtener cantidades ilimitadas de anticuerpos con especificidad predecible y definida (Köhler y Milstein, 1979). Las líneas celulares híbridas resultantes de la fusión entre dos estirpes celulares diferentes: el plasmocitoma o mieloma, por una parte, y los linfocitos B del bazo de ratones inmunizados por otra, recogen la herencia de sus progenitoras siendo capaces de reproducirse de forma indefinida produciendo a la vez anticuerpos dirigidos específicamente contra un epítipo particular del antígeno inoculado (Letchworth y Whyard, 1984; Campbell, 1985; Mateo y cols., 1985; Sanz y cols., 1985; Coppe, 1988).

La incapacidad de neutralización "in vivo" de los anticuerpos anti-VPPA es una de las características más interesantes y determinantes de la infección. La ausencia de esta propiedad podría deberse a la variación de determinados antígenos críticos (García Barreno y cols., 1986). Así, entre los estudios realizados para evaluar la variabilidad antigénica de VPPA destacan la inhibición del fenómeno de la hemoadsorción (Malquist, 1963; Coggins, 1968a; Vigario y cols., 1970), las inoculaciones con virus atenuados que desarrollan una resistencia parcial contra el virus original, pero no frente a otros virus (DeTray, 1963; Malmquist, 1963; Sánchez Botija, 1963a;

Hess y cols., 1965; Stone y Hess, 1967; Pan y cols., 1970; Hess, 1971; DeBoer y cols., 1972; Hess, 1981; Ruiz Gonzalvo y cols., 1983), y la heterogeneidad de los aislados virales que estarían constituidos por subpoblaciones de virus con diferentes propiedades biológicas como son su virulencia, capacidad de hemoadsorción y/o patogenicidad (Pan y Hess, 1984, Pan y Hess, 1985).

En este sentido, también la utilización de anticuerpos monoclonales dirigidos frente a proteínas estructurales y no estructurales (Letchworth y Whyard, 1984; Sanz y cols., 1985; Whyard y cols., 1985; García Barreno y cols., 1986; Wenswoort y cols., 1986; Pan y cols., 1988; Federspiel y cols., 1991) ha puesto de manifiesto la amplia variabilidad antigénica del virus de la VPPA, así la utilización de 39 anticuerpos monoclonales (Tabla 1) desarrollados frente a 10 proteínas virales demostró que los virus de campo cultivados en macrófagos porcinos incrementaban su variabilidad antigénica en una mayor proporción que los virus adaptados a células Vero (García Barreno y cols., 1986). Igualmente se encontraron diferencias antigénicas entre clones de virus aislados de un mismo cerdo infectado (García Barreno y cols., 1986).

En un estudio de 23 aislados víricos de África, Europa y América se demostró que los aislados Africanos difieren entre ellos más que los aislados no Africanos, esto es probablemente debido a que el virus en África ha estado circulando durante mucho tiempo y se ha diversificado (García Barreno y cols., 1986); la uniformidad de los aislados no africanos puede ser debido a que uno o pocos virus entraran en Europa durante 1957-1960 (Manso Ribeiro y cols., 1958; Manso Ribeiro y Rosa Azavedo, 1961; Polo Jover y Sánchez Botija, 1961).

Tabla 1.

<b>PROTEÍNA</b>	<b>ANTICUERPO MONOCLONAL</b> (Sanz y cols., 1985).
<b>PV220/150</b>	14A.E6; 14B.E12; 14B.F1; 17A.H2; 17F.D8; 17F.H1; 17G.F9; 17H.C6; 17I.A10; 18E.B6; 18H.H7.
<b>PV150</b>	17K.C6; 17K.G6.
<b>PV73</b>	1B.C11; 7E.D2; 17F.A7; 17F.E3; 17G.G7; 17K.C1; 17L.D3; 17L.E2; 18A.E11; <u>18B.G3</u> ; 18F.A4; 19B.A2; 19C.B4; 20F.E10.
<b>PV37/60</b>	17F.E10
<b>PV27</b>	18A.H5
<b>PV24</b>	19E.H10
<b>PV22</b>	18A.F3
<b>PV17</b>	17K.G12
<b>PV14</b>	19C.F6; 19D.G8
<b>PV12</b>	2C.G12; 17G.C4; 17H.H3; 17L.F2; 18B.B11.



El empleo de estos anticuerpos demostró la localización en la partícula vírica de distintas proteínas. La PV150 fue localizada en el nucleóide y en un vértice del virión (Carrascosa y cols., 1986) relacionándose antigénicamente (Sanz y cols., 1985) con la proteína no estructural PV220 que se presentó en la membrana y en el núcleo de las células infectadas (Sanz y cols., 1985; Carrascosa y cols., 1986; Santarén y Viñuela, 1986; Carvalho y cols., 1988).

La proteína mayoritaria de la cápside (PV73) fue detectada en las factorías de virus en el citoplasma celular y en la capa intermedia del virión (Sanz y cols., 1985; Whyard y cols., 1985; Carrascosa y cols., 1986). Esta proteína mostró una gran estabilidad entre los distintos aislados víricos (García Barreno y cols., 1986) por lo que ha sido empleada como reactivo en las técnicas inmunoenzimáticas de detección de anticuerpos específicos en las campañas de erradicación de la PPA (Tabarés y cols., 1981; Sánchez-Vizcaíno y cols., 1982).

La proteína estructural PV37 localizada en la capa intermedia del virión (Carrascosa y cols., 1986) está antigénicamente (Sanz y cols., 1985) y bioquímicamente (López-Otín y cols., 1988) relacionada con una proteína no estructural predecesora (PV60); finalmente, las proteínas PV12 y PV14 se encuentran localizadas en las zonas externas del virión (Carrascosa y cols., 1986) presentando ambas variaciones entre los distintos aislados víricos (García Barreno y cols., 1986; Pan y cols., 1988).

## II.3. EPIZOTIOLOGÍA Y PATOGENIA DE LA PPA.

### II.3.1. Datos Epidemiológicos.

La única especie animal doméstica susceptible a la infección por el virus de la PPA es el cerdo de cualquier edad y raza (Hess, 1971; Wilkinson, 1989; Sánchez-Vizcaíno, 1992).

Los jabalíes europeos (*Sus scrofa ferus*) pueden padecer la enfermedad, mostrando el mismo cuadro clínico-lesional que los cerdos domésticos (Polo Jover y Sánchez Botija 1961; Ravaioli y cols., 1967; McVicar y cols., 1981; Contini y cols., 1982; Sánchez Botija, 1982; Firinu y Scarano, 1988). Sin embargo, lo normal es que aquellos cerdos cursen la enfermedad

de un modo menos virulento que los domésticos, sobreviviendo en muchos casos y convirtiéndose en portadores durante un periodo de hasta 12 meses (Sánchez Botija, 1982; Firinu y Scarano, 1988).

En África, el virus se presenta en cerdos salvajes (*Phacochoerus aethiopicus* y *Potamochoerus porcus*) con una clínica inaparente y virémicos (Montgomery, 1921; Steyn, 1932; DeTray, 1957; DeTray, 1961; DeTray, 1963, Heuschele y Coggins, 1965; Hess, 1987a), posibilitando de esta manera la infección de las garrapatas blandas (*Ornithodoros spp*) que parasitan a estos animales.

Las garrapatas, *Ornithodoros moubata* en África (Heuschele y Coggins, 1965; Plowright y cols., 1969b, Plowright y cols., 1970b; Mellor y Wilkinson, 1985; Haresnape y cols., 1987; Haresnape y cols., 1988; Hess, 1987a) y *Ornithodoros errathicus* en España y Portugal (Sánchez Botija, 1963b), juegan un papel de vectores y reservorios del VPPA (Kovalenko, 1965; Plowright y cols., 1969a; Hess, 1971; Wilkinson y cols., 1977b; McVicar, 1984; Geering y cols., 1986). En este sentido, se ha demostrado la transmisión transovárica y sexual del VPPA en el *Ornithodoros moubata* (Plowright y cols., 1969a; Plowright y cols., 1969b; Plowright y cols., 1970a; Plowright y cols., 1970b; Hess, 1987a), así como la persistencia del virus en el *Ornithodoros errathicus* durante 8 años (Sánchez Botija, 1982). Recientemente se han descubierto otras especies de garrapatas en África y América capaces de transmitir el VPPA (Groocock y Hess, 1980; Mellor y Wilkinson, 1985; Geering y cols., 1986; Endris y cols., 1987; Hess, 1987a; Endris y cols., 1992).

Los animales enfermos y portadores constituyen las fuentes de virus, pudiendo ser eliminado durante la fase virémica por todas las secreciones y excreciones (Montgomery, 1921; Greig y Plowright, 1970; McVicar, 1984), con las que los animales sanos se infectarían con una especial incidencia a través de la vía oronasal (Scott, 1965; Heuschele, 1967; Plowright y cols., 1968; Colgrove y cols., 1969; Greig, 1972; Wilkinson y cols., 1977b). También, y como vía secundaria de infección, el virus puede penetrar mediante la inoculación transcutánea por picadura de artrópodos y material quirúrgico contaminado (Kovalenko, 1965; Plowright y cols., 1969a; Sánchez Botija y Ordás, 1980; McVicar, 1984; Saliki y cols., 1985; Sánchez-Vizcaíno, 1986a).

El virus de la PPA es muy resistente a la inactivación en el medio ambiente (Scott, 1965;

Hess, 1971) pudiendo permanecer infectante a temperatura ambiente en suero hasta 18 meses (Montgomery, 1921). Para inactivarlo por calor se debe someter a 60° C durante 30 minutos (Montgomery, 1921, Plowright y Parker, 1967). Es estable entre pH 4 y 13 (Plowright y Parker, 1967; Hess, 1971; Mebus, 1988), pero es sensible a los disolventes lipídicos (Hess, 1971; Stone y Hess, 1973). En la carne de cerdo puede mantenerse durante meses (Sánchez Botija, 1982; Sánchez- Vizcaíno, 1992) inactivándose a temperaturas superiores a los 75°C (McVicar, 1984, Sánchez-Vizcaíno, 1992).

### II.3.2. Patogenia de la PPA.

La mayoría de autores coinciden en apuntar que la vía oronasal, digestiva y la respiratoria son las puertas de entrada del virus en el organismo, aunque las últimas se consideran de carácter accesorio (Kovalenko, 1965; Hess, 1971; Sánchez Botija, 1982; McVicar, 1984; McDaniel, 1986; Mebus, 1988). En infecciones experimentales, Montgomery en 1921 no consiguió la transmisión vía aerógena, sin embargo, Kovalenko en 1965 y Wilkinson y cols. en 1977, señalaron la vía nasal como importante punto de entrada, así como la diseminación aerógena del virus.

La dosis infectiva al 50% por vía oronasal ha sido determinada en  $10^3$ - $10^5$  HAD<sub>50</sub> (Heuschele, 1967; Greig, 1972; McVicar, 1984) siendo de 10 HAD<sub>50</sub> para la vía parenteral mediante picadura de garrapatas o por material quirúrgico (Plowright y cols., 1969a; McVicar, 1984).

En una experiencia en la que se administró intranasalmente una dosis de  $10^5$  HAD<sub>50</sub> del aislado vírico Tengani, clasificado como altamente virulento y patógeno (Pan y Hess, 1984), éste fue aislado de tonsilas y ganglios mandibulares a las 24 hpi por lo que se sugirió que el virus replica primariamente en tonsilas con diseminación posterior a los ganglios regionales (Heuschele, 1967) en los cuales se localizaría y multiplicaría (Plowright y cols., 1968; Colgrove y cols., 1969; Greig y Plowright, 1970, Hess, 1971; Greig, 1972; Wilkinson y Donaldson, 1977a; McVicar, 1984). En cerdos jóvenes expuestos por contacto, ha sido señalada también la posibilidad de la infección a través de la mucosa nasal, bronquial y gastrointestinal, con replicación primaria en

los ganglios linfáticos regionales (Plowright y cols., 1968; Colgrove y cols., 1969; Greig, 1972; Wilkinson y Donaldson, 1977a).

Después de la replicación primaria se produce la difusión del virus por vía linfohemática (Heuschele, 1967; Plowright y cols., 1968; Colgrove y cols., 1969; Greig, 1972), dando lugar a una viremia primaria que se presenta entre las 8 y 12 hpi con diseminación orgánica lo que provoca una viremia secundaria entre las 15 y 24 dpi. (Colgrove y cols., 1969; Coggins, 1974; Plowright, 1980). Las partículas víricas son vehiculadas en sangre adheridas a los eritrocitos, en los leucocitos infectados, demostrándose este fenómeno desde el primer día postinfección (Heuschele, 1967; Colgrove, 1968; Colgrove y cols., 1969; Plowright, 1980), o bien, libres en el plasma (Heuschele, 1967; Plowright y cols., 1968; Wardley y Wilkinson, 1977a; Knudsen, 1987a; Genovesi y cols., 1988).

El fenómeno de adherencia de las partículas víricas a la membrana plasmática de los eritrocitos es uno de los mecanismos más importante de diseminación del virus en el organismo (Larenaudie y cols., 1967; García-Gancedo y cols., 1974a; Wardley y Wilkinson, 1977a; Alves de Matos y cols., 1981; Wesley y cols., 1984; Ducatelle y Hoorens, 1986; Quintero y cols., 1986). La unión de los virus a los eritrocitos facilitarfa, según algunos autores (Plowright, 1968; Wesley, 1984), su permanencia en el torrente circulatorio al ser más difícilmente captados por las células fagocitarias. Sin embargo, esta relación virus-eritrocito provoca una mayor fragilidad celular lo que paradójicamente inducirfa una eliminación más rápida por parte del Sistema Mononuclear Fagocítico (SMF) (Wardley y Wilkinson, 1977a).

La aparición del virus en bazo, médula ósea e hígado se produce a los 2 dpi, alcanzando rápidamente altos títulos lo que sugiere que éstos son órganos de multiplicación vírica secundaria (Heuschele, 1967; Plowright y cols., 1968; Coggins, 1974; McVicar, 1984). Los mayores títulos de virus en el bazo y en otros órganos ricos en células del Sistema Mononuclear Fagocítico, como ganglios linfáticos, hígado, pulmón, médula ósea y riñón se observan a las 72 hpi o más tarde, coincidiendo con la pirexia que aparece normalmente a partir de los 3 dpi (Heuschele, 1967; Plowright y cols., 1968; Colgrove y cols., 1969; Dardiri y Hess, 1970; Hess, 1971; Greig, 1972; Coggins, 1974; Hess, 1981; Wilkimson y cols., 1981; Edwards y cols., 1985c; Mebus, 1987; Ekue y cols., 1989). A partir de los 3 dpi, los virus altamente virulentos pueden ser localizados

en cualquier órgano, preferentemente en aquellos ricos en células del SMF donde se establece una infección productiva que induce efectos citopáticos y muerte celular (Dardiri y Hess, 1970; Mebus, 1988; Fernández y cols., 1992a).

La infección celular comienza con el contacto y entrada del virus en las células blanco así, en estudios "in vitro" con macrófagos porcinos o células Vero se ha observado que ésta tiene lugar mediante un mecanismo de endocitosis mediada por un receptor específico (Valdeira y Geraldés, 1985; Viñuela, 1985; Geraldés, 1987; Alcamí y cols., 1989; Alcamí y Viñuela, 1991).

Después de establecida la infección, la replicación vírica induce cambios que han sido puestos de manifiesto en cultivos celulares en los que se aprecia un redondeamiento de las células (Haag y Larenaudie, 1965; Wardley y cols., 1979; Wardley y cols., 1983; Arias y cols., 1986), vacuolización del retículo endoplásmico e incremento de las estructuras lisosomiales, produciéndose finalmente la lisis celular (Hess y DeTray, 1960; Greig y cols., 1967; Wardley y Wilkinson, 1977b; Wardley y cols., 1979; Wardley y cols., 1983; Knudsen y cols., 1987b). A nivel nuclear, estos cambios comienzan con procesos de cariorrexis manifestados por la densificación de la cromatina en forma de grumos cada vez más gruesos, que se localizan próximos a la envoltura nuclear y se acompañan de la aparición de estructuras fibrilares (Haag y Larenaudie, 1965; Breese y DeBoer, 1966a; Sánchez Botija, 1967; Hess, 1971; Moura Nunes y cols., 1975; Wardley y cols., 1983).

Estos fenómenos también se han descrito ultraestructuralmente en la infección "in vivo" de monocito/ macrófagos (Moura Nunes y Nunes Petisca, 1983), células de Kupffer y hepatocitos (Sierra y cols., 1987; Gómez-Villamandos, 1988; Sierra y cols., 1991), macrófagos intravasculares pulmonares (MIPs), macrófagos alveolares e intersticiales del pulmón (Carrasco, 1988; Sierra y cols., 1990a) y en células endoteliales (Quezada, 1988; Sierra y cols., 1989).

El ensamblaje del virus se realiza en el citoplasma a nivel de los centros de replicación o cuerpos de inclusión (Breese y DeBoer, 1967; Pan y cols., 1980; Wardley y cols., 1983). Estas zonas han sido puesta de manifiesto mediante la tinción de Giemsa (Colgrove, 1968; Coggins, 1974) Feulgen (Haag y Larenaudie, 1965; Coggins, 1974), Azul de Toluidina (Sierra y cols., 1987), inmunofluorescencia (Heuschele y cols., 1966; Colgrove, 1968; Bool y cols., 1969;

Colgrove y cols., 1969; Dardiri y Hess, 1970; Coggins, 1974; Wardley y cols., 1979; Pan y cols., 1980; Mebus, 1987; Carvalho y cols., 1988) e inmunoperoxidasa (Castro Portugal y cols., 1976; Fernández y cols., 1992b). Mediante microscopía electrónica se ha observado que están constituidos por partículas víricas maduras completas, incompletas y abundantes estructuras membranosas precursoras de las envueltas del virus (Moura Nunes y cols., 1975; Wardley y cols., 1979; Alves de Matos y cols., 1980a; Alves de Matos y cols., 1980b; Wardley y cols., 1983; Nesor y cols., 1986; Sierra y cols., 1987; Sierra y cols., 1990a; Sierra y cols., 1990b) y se encuentran rodeados por orgánulos celulares (Moura Nunes y cols., 1975; Alves de Matos y cols., 1980a) con reorganización periférica del citoesqueleto celular (Carvalho y cols., 1988).

Otro de los fenómenos más característicos de la infección de macrófagos por el VPPA, es la capacidad de hemoadsorción de las células infectadas, señalado como una de las propiedades esenciales del VPPA (Malmquist y Hay, 1960; Malmquist, 1962; Breese y Hess, 1966b; Greig y cols., 1967; Larenaudie y cols., 1967) que ha sido utilizada, junto a otras propiedades, para la clasificación de los distintos aislados virales (Malmquist y Hay, 1960; Malmquist, 1963; Coggins, 1968a; Vigarío y cols., 1970; DeBoer y cols., 1972; Pan y Hess, 1984; Pan y Hess, 1985).

La observación del fenómeno de hemoadsorción se ha utilizado "in vitro" en cultivos de células de médula ósea y en cultivos de leucocitos de sangre como técnica de diagnóstico de la PPA (Hess y DeTray, 1960; Malmquist y Hay, 1960; Tubiash, 1963; Sánchez Botija, 1967; Sánchez Botija y Ordás, 1980; Sánchez-Vizcaíno, 1986a; Knudsen y cols., 1987b; Sánchez-Vizcaíno, 1992) así como también, en la titulación del virus (Heuschele, 1967; Plowright y cols., 1968; Colgrove y cols., 1969; Greig, 1972; Enjuanes y cols., 1976a; Wilkinson y cols., 1981; McVicar, 1984; Pan y Hess, 1984). Este método es de gran importancia, ya que ningún otro virus que afecta al ganado porcino posee esta propiedad (Malmquist y Hay, 1960; Sánchez-Vizcaíno, 1986a). Sin embargo, hay que tener en cuenta que existen cepas de VPPA no hemoadsorbentes (Pini, 1976; Sánchez Botija, 1982), y que la capacidad de hemoadsorción de una cepa puede perderse tras una serie de pases en cultivos celulares (Coggins, 1968b; Sánchez Botija y Ordás, 1980), si bien pueden mantener el resto de las características de crecimiento y su efecto citopático (Thomson y cols., 1979; Sánchez Botija y Ordás Álvarez, 1980). Además se ha comprobado que una cepa no hemoadsorbente puede transformarse en hemoadsorbente cuando se inocula en cerdos lo que confirma la variabilidad biológica de este virus al relacionarse con la célula huésped

(Coggins, 1968b).

Este fenómeno descrito "in vitro" desde 1960, ha sido demostrado "in vivo" en infecciones experimentales utilizando los aislados E70 y E75 (Gómez-Villamandos, 1988; Sierra y cols., 1991). La morfología de los fenómenos de hemoadsorción se caracteriza por la formación de una corona de eritrocitos alrededor del leucocito infectado por el VPPA apareciendo éste al microscopio óptico con un efecto citopático principalmente nuclear (Malmsquist y Hay, 1960; Breese y Hess, 1966b; Larenaudie y cols., 1967; Sánchez-Vizcaíno, 1986a; Knudsen y cols., 1987b; Sierra y cols., 1991; Fernández y cols., 1992b).

Ultraestructuralmente, se comprueba la presencia de un centro de replicación vírica en los leucocitos infectados junto al redondeamiento celular y la hipercromatosis parietal en el núcleo. Los eritrocitos aparecen adheridos a la membrana citoplasmática del leucocito, formándose una zona electrodensa entre ambos, no observándose partículas víricas que sirvan de puente y/o que participen directamente en este fenómeno (Breese y Hess, 1966b; Larenaudie y cols., 1967; Gómez-Villamandos, 1988).

Los antígenos que inducen el fenómeno de la hemoadsorción podrían estar localizados en la envuelta del virión (Vigario y cols., 1970, Sánchez-Vizcaíno, 1986a). Se ha sugerido que la proteína hemoadsorbente sería sintetizada dentro de las células infectadas expresándose en la membrana plasmática, por lo que pudiera tratarse de una de las 12 proteínas caracterizadas en la membrana de las células infectadas (Alcaraz y cols., 1989).

Por otra parte, los aislados de virus de la PPA con moderada o escasa patogenicidad, pueden inducir infecciones víricas persistentes (Mebus y Dardiri, 1979; Wardley y cols., 1979; Mebus y Dardiri, 1980; Slauson y Sánchez-Vizcaíno, 1981; Wilkinson y cols., 1983; McVicar, 1984) localizándose el virus preferentemente en los órganos linfoides. En estos casos el virus ha sido aislado de sangre hasta 56 dpi, y de ganglios linfáticos y tonsilas hasta 92 dpi (Mebus y Dardiri, 1979; Ordás y cols., 1983b; Wilkinson y cols., 1983; McVicar, 1984), en donde persistiría asociado a células macrofágicas (Enjuanes y cols., 1977; Wardley y cols., 1979).

## II.4. MECANISMOS PATOGENICOS DE LAS HEMORRAGIAS EN LA PPA.

Los virus que causan fiebres hemorrágicas (Gans y Lowman, 1978; Halstead y cols., 1978; Morgensen, 1979; Oldstone y cols., 1982), poseen tropismo por células con importantes funciones hemostáticas tales como los hepatocitos, células endoteliales, monocito/ macrófagos y megacariocitos. Estos virus alteran los mecanismos de hemostasia a través de dos vías: por acción directa sobre las funciones celulares, o mediante la activación de las vías inmunitaria e inflamatoria.

La interrelación entre hemostasia, inmunidad e inflamación es muy compleja (Osterud y cols., 1980; Pesce y Dosekun, 1982), por una parte los mediadores inmunitarios e inflamatorios modulan las funciones hemostáticas, y por otra, las proteínas de la coagulación tienen acciones que contribuyen al proceso inflamatorio y alteran la respuesta inmune.

Algunos mecanismos que conducen a la producción de hemorragias en las enfermedades víricas son:

### II.4.1. Trombocitopenia.

En las fiebres víricas hemorrágicas es constante la observación de trombocitopenia (Oldstone y cols., 1982). Los mecanismos que conducen a ella pueden ser la disminución de la trombocitopoyesis por infección de los megacariocitos, agregación inmunológica plaquetaria, infección plaquetaria, Coagulación Intravascular Diseminada (CID) y lesiones endoteliales (Halstead y cols., 1978; Axthelm y Krakowka, 1987; Corapi y cols., 1990).

En la PPA, los cerdos inoculados con cepas moderadamente virulentas desarrollan trombocitopenia a los 7-8 dpi, retornando a los valores normales a los 13-15 dpi (Edwards y cols., 1985a; Edwards y cols., 1985b; Edwards y cols., 1985c; Villeda y cols., 1993), observándose en este tiempo postinfección una hiperplasia de megacariocitos en la médula ósea. Las cepas virulentas causaron trombocitopenia desde los 2-3 dpi hasta la muerte, con un tiempo de hemorragia marcadamente prolongado, así como una disminución de la agregación plaquetaria



y de la retracción del coágulo (Edwards y cols., 1985b; Edwards y cols., 1985c; Nesser y Kotzé, 1987; Villeda y cols., 1993).

A pesar de la observación de la infección del 2 al 10% de los megacariocitos con aislados de moderada virulencia (Edwards y cols., 1985b), y de los cambios ultraestructurales y funcionales observados en las plaquetas de animales inoculados con cepas virulentas (Nesser y cols., 1986; Nesser y Kotzé, 1987), la acción directa del VPPA sobre los megacariocitos y/o plaquetas parece no tener la suficiente importancia para mediar la trombocitopenia observada en las fases más críticas de la enfermedad (Edwards y cols., 1985b; Anderson, 1986; Mebus, 1988).

Entre el 1 y el 20% de las plaquetas de cerdos inoculados con los aislados Malawi y República Dominicana II, que murieron entre los cuatro y seis dpi, presentaban alteraciones caracterizadas por vacuolización e hinchazón citoplasmática, pérdida de gránulos densos, fragmentación y dilatación del sistema canalicular y pérdida de orgánulos. Un 4% de las plaquetas tenían un tamaño mayor que el de los eritrocitos, siendo consideradas como inmaduras debido a que su citoplasma era poco granular y no vacuolizado (Nesser y cols., 1986). También, los estudios ultraestructurales mostraron partículas víricas sin envuelta en el citoplasma de plaquetas, así como numerosas estructuras membranosas laminares, abiertas o cerradas, que se consideraron como la expresión de los fenómenos de replicación vírica en estas células (Nesser y col., 1986).

En la enfermedad subaguda y crónica, la aparición de trombocitopenia parece estar mediada por complejos antígeno- anticuerpo que se forman tempranamente en el curso de la enfermedad, durante un período de exceso de antígeno (Edwards y cols., 1985c). Aunque se ha observado la agregación plaquetaria mediada por fenómenos inmunológicos (Clarck y cols., 1980; Slauson y Sánchez-Vizcaíno, 1981; Roitt y cols., 1986; Axthelm y Krakowka, 1987; Clabough, 1990), parece poco probable que la trombocitopenia se inicie de esta forma en la PPA, ya que el recuento de plaquetas empieza a disminuir a partir del segundo dpi (Edwards y cols., 1985b; Anderson, 1986; Anderson y cols., 1987), periodo en que no se detectan anticuerpos anti-virus (Mebus y cols., 1983; Anderson, 1986; Mebus, 1988).

Entre los mecanismos que se han citado como causantes del inicio de esta trombocitopenia temprana estaría el aumento de adenosin-difosfato (ADP) procedente en parte de la destrucción

de eritrocitos y productor de agregación plaquetaria (Anderson, 1986; Anderson y cols., 1987; Nesser y Kotzé, 1987; Honor, 1991; Gentry, 1992). Otra posibilidad vendría determinada por la liberación de ácido araquidónico por parte de los macrófagos dañados que induce la producción de metabolitos, como la prostaglandina E (PGE<sub>2</sub>), que favorecen la agregación plaquetaria y los fenómenos de vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular; simultáneamente se produce una disminución en la producción y liberación de prostaciclina antiagregante plaquetaria (PGI<sub>2</sub>) indicadora de la alteración funcional de las células endoteliales (Lasser, 1982; Anderson, 1986; Diebold, 1986; Anderson y cols., 1987; Honor, 1991, Gentry, 1992). Todo ello podría estar relacionado en la PPA con la activación y destrucción de las células blanco del virus y pertenecientes al Sistema Mononuclear Fagocítico, las cuales además producen y liberan otros factores como la Interleukina 1, y el Factor de Necrosis Tumoral (FNT) que poseen, entre otras actividades, la de favorecer la actividad procoagulante de las células endoteliales (Gentry, 1992).

#### **II.4.2. Reducción de los factores de la coagulación.**

Esta reducción puede deberse bien, a un aumento de consumo como ocurre en la CID o bien, a una disminución de su síntesis causada probablemente por las lesiones hepáticas, ya que el hígado es el órgano en el que se sintetizan la mayoría de los factores de la coagulación (Gans y Lowman, 1978; Oldstone y cols., 1982).

El tropismo del VPPA por las células del SMF, así como la replicación en células endoteliales y hepatocitos (Sierra y cols., 1987; Gómez-Villamandos, 1988; Sierra y cols., 1990b; Pérez, 1992) pueden activar los procesos de la coagulación disminuyendo paralelamente la síntesis de los factores de ésta dando lugar a una predisposición del animal a padecer hemorragias (Quezada y cols., 1989; Sierra y cols., 1989).

#### **II.4.3. Coagulación Intravascular Diseminada (CID).**

EL mecanismo patogénico de la CID ha sido considerado en la PPA (Edwards y cols., 1985b; Pan, 1987; Sierra y cols., 1987; Mebus, 1988). La activación diseminada del sistema de

---

la coagulación, bien por la vía intrínseca o por la extrínseca (ambas demostradas en la PPA)(Villeda y cols., 1993), producen una coagulopatía de consumo, que conduce al depósito de microtrombos en pequeños vasos con la consiguiente diátesis hemorrágica, caracterizada por petequias y equimosis en diferentes órganos (Anderson, 1986; Pan, 1987; Villeda y cols., 1993).

Como activadores de la CID en la PPA se han considerado la destrucción de las células del SMF, de células parenquimatosas, y de células endoteliales con virus virulentos (Anderson, 1986; Anderson y cols., 1987; Sierra y cols., 1987; Sierra y cols., 1989) así como la presencia de inmunocomplejos circulantes en las formas subagudas y crónicas.

#### **II.4.4. Lesión Vascular/ Disfunción endotelial.**

Las células endoteliales juegan un papel crucial sobre la regulación de la permeabilidad vascular y el control de la hemostasis, pudiendo modificarse éstas a través de la acción de los mediadores biológicos o mediante la lesión directa de las propias células endoteliales (Edwards y cols., 1984; Anderson, 1986). Está demostrado que muchos virus que producen fiebres hemorrágicas infectan células endoteliales con las consiguientes consecuencias hemostáticas (Oldstone y cols., 1982).

Numerosos autores han descrito en la PPA trombosis en vasos sanguíneos de distintos órganos (Maurer y cols., 1958; Moulton y Coggins, 1968; Konno y cols., 1971a; Nunes Petisca y Martins Gonçalves, 1976; Pan, 1987; Quezada y cols., 1989). Son escasos los datos sobre la replicación del virus de la PPA en las células endoteliales, en este sentido se observó que las células endoteliales cultivadas "in vitro" procedentes de cerdos infectados a los 2-3 dpi liberan virus infectante durante varios días, lo que indicaría que existe replicación en estas células (Wilkinson y Wardley, 1978; Anderson, 1986; Anderson y cols., 1987).

Mediante técnicas de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa se ha observado antígeno vírico en un número muy escaso de células endoteliales (Colgrove y cols., 1969; Coggins, 1974; Pan y cols., 1975; Slauson y Sánchez-Vizcaíno, 1981; Pan, 1987; Martín-Fernández y cols., 1991). Asimismo, los estudios con microscopía electrónica, han demostrado la replicación del

VPPA altamente virulento (aislado E70) en células endoteliales de capilares intersticiales renales a los 7 dpi (Quezada, 1988, Sierra y cols., 1989); observándose un claro efecto citopático con hinchamiento celular y desplazamiento marginal de la cromatina, así como la presencia de centros de replicación vírica. Estos estudios, sugieren que existe contribución de estos fenómenos en las lesiones hemorrágicas de la PPA aguda y subaguda (Maurer y cols., 1958; Moulton y Coggins, 1968; Konno y cols., 1972; Mebus, 1988; Sierra y cols., 1989).

#### **II.4.5. Activación de leucocitos.**

Como respuesta a numerosos estímulos, los monocitos y macrófagos sintetizan monoquinas que afectan a la hemostasia (Unanue, 1976; Osterud y cols., 1980; Lasser, 1982; Bertram, 1986; Diebold, 1986; Bertram y cols., 1989; Clabough, 1990). Por otra parte, estas células fagocitan de la circulación factores de la coagulación activados y factores biológicos antiagregantes, predisponiendo su alteración al desarrollo del mecanismo de la CID (Morgensen, 1979; Honor, 1991).

Las células blanco primarias del VPPA son las células del SMF (Enjuanes y cols., 1977; Wardley y Wilkinson, 1977b; Wardley y cols., 1983; Anderson y cols., 1987; Wilkinson, 1989). La liberación masiva de productos activos tras la destrucción o la activación de estas células parece que es determinante en los cuadros agudos de la enfermedad (Edwards y cols., 1984; Edwards y cols., 1985c; Carrasco y cols., 1992; Villeda y cols., 1993).

Finalmente, en las formas subaguda y crónica de la PPA, la respuesta inmune desarrollada da lugar a la formación de anticuerpos fijadores de complemento y mediadores de citotoxicidad que median fenómenos de quimiotaxis leucocitaria y permeabilización vascular (William y cols., 1976; Slauson y Sánchez-Vizcaíno, 1981; Norley y Wardley, 1982; Norley y Wardley, 1983b; Bielefeldt Ohmann y Babink, 1986; Honor, 1991).

## II.5. PATOLOGÍA DE LA PESTE PORCINA AFRICANA.

### II.5.1. Tonsilas.

Son escasas las descripciones lesionales de las tonsilas en la PPA, estando caracterizada las mismas por congestión y hemorragias petequiales superficiales (Dardiri y Hess, 1970; Rodríguez y cols., 1972). Histológicamente, estos fenómenos vasculares se evidencian por una marcada congestión, edema y hemorragia (Moulton y Coggins, 1968; Mebus y cols., 1983). En animales inoculados con aislados virulentos, se observa depleción linfocitaria junto a fenómenos de degeneración y necrosis de macrófagos localizados en las áreas interfoliculares, intensificándose en los casos graves, los fenómenos de necrosis en los centros germinales (Moulton y Coggins, 1968; Mebus y Dardiri, 1979; Mebus, 1987; Mebus, 1988). En cambio, los aislados moderadamente virulentos inducen la aparición de mitosis celulares en las mismas áreas (Mebus, 1987; Mebus, 1988) siendo considerablemente menos intensos los fenómenos degenerativo-necróticos. En fases avanzadas de la infección se ha observado necrosis del epitelio que tapiza las criptas con presencia en el fondo de éstas de restos epiteliales, células inflamatorias y bacterias (Mebus y cols., 1983).

El antígeno viral detectado mediante técnicas de inmunofluorescencia, se ha localizado en macrófagos y células reticulares del estroma de las áreas interfoliculares y subepiteliales (Boulanger y cols., 1967; Colgrove y cols., 1969; Pan, 1987). Ocasionalmente se observó fluorescencia específica en células epiteliales y macrófagos intraepiteliales (Colgrove y cols., 1969). En los estadios finales de la infección, los folículos quedan delimitados por abundantes células fluorescentes con algunas células reticulares positivas en los centros germinativos (Colgrove y cols., 1969).

La técnica de la hibridación "in situ" ha detectado positividad en las células reticulares del estroma y, ocasionalmente, en células de los folículos linfoides (Galo y Nunes Petisca, 1990).

### II.5.2. Ganglios Linfáticos.

Las lesiones macrocópicas más importantes abarcan desde un ligero aumento de tamaño, edematización y ligeras hemorragias subcapsulares, hasta la presencia de hemorragias masivas que afectan a la totalidad del parénquima apareciendo imágenes de verdaderos coágulos sanguíneos (Montgomery, 1921; Manso Ribeiro y cols., 1958; Gracia, 1961; Maurer y cols., 1964; Nunes Petisca; 1965a; Moulton y Coggins, 1968; Castagnoli, 1969; Gayot y cols., 1974; Ruiz Martínez, 1978; Mebus y Dardiri, 1979; Plowright, 1980; Wilkinson y Lawman, 1980; Hess, 1981; Wilkinson y cols., 1981; McDaniel, 1986; Ekue y cols., 1989; Jubb y cols., 1993; Sierra y cols., 1993). Los ganglios más frecuentemente afectados suelen ser los gastrohepáticos, los renales y, en menor medida los mesentéricos si bien, aparecen lesiones de distinta intensidad en todos los ganglios (Falcón y Núñez, 1960; Séculi y Costa, 1961; Maurer y cols., 1964; Nunes Petisca, 1965b; Moulton y Coggins, 1968; Lucas y cols., 1970; Rodríguez y cols., 1972; Nunes Petisca y Martins Gonçalves, 1976; Mebus y Dardiri, 1979; Plowright, 1980; Sánchez Botija y Ordás, 1980; Wilkinson y cols., 1981; Mebus, 1988; Jubb y cols., 1993; Sierra y cols., 1993).

Histológicamente, las lesiones más graves se observan en las áreas ricas en células reticulares como son las zonas paracorticales, interfoliculares y vénulas postcapilares (Moura Nunes y Nunes Petisca, 1983; Mebus, 1987; Mebus, 1988; Wilkinson, 1989). Estas células reticulares y las células mononucleares infiltradas en el estroma de los senos son las que primero sufren los procesos de degeneración y necrosis (Moulton y Coggins, 1968; Colgrove y cols., 1969; Konno y cols., 1971a; Nunes Petisca y Martins Gonçalves, 1976; Mebus y Dardiri, 1979; Plowright, 1980; Fernández y cols., 1992a). Esta necrosis es seguida de hemorragias que comienzan a observarse en las zonas más superficiales y avanzan hacia el interior afectando primariamente al tejido medular ganglionar y posteriormente a todo el órgano (Maurer y cols., 1964; Mebus y Dardiri, 1979; Mebus, 1987; Sierra y cols., 1993).

Los centros germinales son las estructuras más conservadas de los ganglios en la PPA aguda, aunque en casos graves prácticamente desaparecen o quedan reducidos a un grupo de células linfoblásticas o reticulares de núcleos picnóticos, al ser el resto de estructuras invadidas por eritrocitos (Maurer y cols., 1958; Moulton y Coggins, 1968; Colgrove y cols., 1969; Konno y cols., 1971a; Coggins, 1974; Mebus y cols., 1983; Mebus, 1987).

Los vasos sanguíneos, particularmente las arteriolas y las vénulas postcapilares, pueden presentar degeneración hialina de la túnica media con acúmulos de material PAS positivo (Manso Ribeiro y cols., 1958; Maurer y cols., 1958; Sécúli y Costa, 1961; Rodríguez y cols., 1972; Nunes Petisca y Martins Gonçalves, 1976; Plowright, 1980; Mebus, 1987). Este engrosamiento de las paredes vasculares junto a las lesiones de trombosis y necrosis son observadas en las fases más avanzadas de la enfermedad (Maurer y cols., 1964; Moulton y Coggins, 1968; Colgrove y cols., 1969; Nunes Petisca y Martins Gonçalves, 1976), llegan a ocluir la luz (Maurer y cols., 1958; Falcón y Núñez, 1960; Sécúli y Costa, 1961; Rodríguez y cols., 1972) siendo responsables de las lesiones hemorrágicas y de la necrosis isquémica celular que caracteriza a la PPA aguda en los ganglios linfáticos (Maurer y cols., 1958; Moulton y Coggins, 1968).

En la forma crónica o en la inaparente por aislados atenuados, los ganglios presentan una proliferación de células reticulares en los senos, hiperplasia de los folículos con aumento de los centros germinales e infiltración mononuclear en el tejido conectivo y senos linfáticos capsulares (DeKock y cols., 1940; Moulton y Coggins, 1968; Konno y cols., 1971a; Coggins, 1974; Nunes Petisca y Martins Gonçalves, 1976; Mebus y Dardiri, 1979; Hess, 1981; Sierra y cols., 1986; Wilkinson, 1989; Fernández y cols., 1992a; Sánchez-Vizcaíno, 1992).

Mediante técnicas de inmunofluorescencia el antígeno vírico ha sido observado en macrófagos fijos y libres de los ganglios, fundamentalmente en los senos subcapsulares, áreas paracorticales y regiones interfoliculares (Boulanger y cols., 1966; Boulanger y cols., 1967; Bool y cols., 1969; Colgrove y cols., 1969; Coggins, 1974; Pan, 1987; Mebus, 1988). En las últimas fases de la infección puede ser detectada fluorescencia granular en la pared de los vasos sanguíneos, así como en restos necróticos (Colgrove y cols., 1969).

Con técnicas de inmunoperoxidasa y empleando un suero hiperinmune los antígenos víricos se detectan en macrófagos libres y fijos de los senos linfáticos (Mínguez y cols., 1988; Fernández y cols., 1991a; Fernández y cols., 1992a) observándose, con cepas virulentas, un aumento del mismo conforme avanza el proceso; ocasionalmente se ha demostrado antígeno en neutrófilos y células probablemente endoteliales con el aislado muy virulento E70 (Fernández y cols., 1992a). Con el aislado E75, las cantidades de antígeno en los ganglios fueron muy escasas al haberse descrito únicamente a partir de los 9 dpi (Fernández y cols., 1992a).

Utilizando una técnica inmunohistológica de doble marcaje se identificaron las células infectadas por el virus moderadamente virulento Malta 78, describiéndose éste únicamente en macrófagos de las áreas paracortical y medular de los ganglios linfáticos, con escasa reacción en los centros germinales, no pudiéndose demostrar la infección en linfocitos T (González y cols., 1985b; Mínguez y cols., 1988).

El único trabajo realizado con la técnica de hibridación "in situ", demuestra inmunorreacción en células reticulares de las áreas medulares y zonas marginales de los folículos (Galo y Nunes Petisca, 1990).

Los estudios ultraestructurales en infecciones con virus de distinta patogenicidad han demostrado la replicación del VPPA en macrófagos ganglionares a partir de los 2 dpi en cerdo inoculados con cepas altamente virulentas (Moura Nunes y cols., 1975; Moura Nunes y Nunes Petisca, 1983). Utilizando el aislado E70 se ha descrito replicación vírica en abundantes monocitos en la luz de las vénulas postcapilares junto a numerosas plaquetas, eritrocitos y restos celulares a partir de los 5 dpi. A los 7 dpi los vasos se presentaron dilatados y sus paredes necrosadas apreciándose en ellas un material granular amorfo con algunas partículas víricas (Pérez, 1989). En esta misma experiencia se observó una notable necrosis de macrófagos y linfocitos del tejido medular y linfoide difuso desde los 5 dpi determinándose como característica diferencial la aparición de un espacio vacío con restos acidófilos alrededor de los macrófagos y no así, en la necrosis de los linfocitos (Pérez, 1989).

### **II.5.3. Bazo.**

Macroscópicamente el bazo, junto con los ganglios y el riñón, son los órganos más afectados por el VPPA (Sánchez Botija, 1980; Ordás, 1983a; Sierra y cols., 1993).

La mayoría de los autores coinciden en afirmar que la principal lesión que se presenta en el bazo es una esplenomegalia hiperémica de distinta intensidad (Montgomery, 1921; DeKock y cols., 1940; Gracia, 1961; Moulton y Coggins, 1968; Lucas y cols., 1970; Konno y cols., 1971a; Konno y cols., 1972; García-Gancedo y cols., 1974a; Sánchez Botija, 1980; Arias y cols., 1986; Mebus, 1988), si bien otros autores (Maurer y cols., 1958), usando un aislado de campo,



encontraron un tamaño normal en la mayoría de los bazos. El bazo aparece aumentado de tamaño, con los bordes redondeados y de color oscuro (Kovalenko y cols., 1967; Moulton y Coggins, 1968; Colgrove y cols., 1969; Dardiri y Hess, 1970; Lucas y cols., 1970; Hess, 1971; Konno y cols., 1971a; Konno y cols., 1972; Mebus y Dardiri, 1979; Wilkinson y cols., 1981; McDaniel, 1986; Mebus, 1988; Wilkinson, 1989; Topley, 1990). A nivel subcapsular pueden presentarse hemorragias (Montgomery, 1921; Steyn, 1928; Gracia, 1961; Wilkinson y Lawman, 1980; Hess, 1981) o bien, infartos triangulares pequeños de color rojo oscuro (Maurer y cols., 1958; Séculi y Costa, 1961; Castagnoli y cols., 1967; Kovalenko y cols., 1967; Moulton y Coggins, 1968; Plowright, 1980; Arias y cols., 1986; Sierra y cols., 1993). La superficie de corte es granular, rojo oscura, con pérdida del marcado folicular y trabecular (De Kock y cols., 1940; Doyle, 1961; Moulton y Coggins, 1968; Konno y cols., 1972) y, a veces, con focos necróticos pequeños de color blanco amarillento (Maurer y cols., 1958, Nunes Petisca, 1965b).

En las formas crónicas e infecciones con virus atenuados, el bazo aparece moderadamente aumentado de tamaño, con aspecto carnoso y ligeramente aumentado de color (Nunes Petisca, 1965b; Konno y cols., 1972; Hess, 1981; Mebus y Dardiri, 1979; Sierra y cols., 1986; Mebus, 1987; Sierra y cols., 1993).

Histológicamente, la pulpa esplénica blanca presenta procesos degenerativos con atrofia del tejido linfoide y disminución del número de linfocitos en los folículos (Maurer y cols., 1958; Moulton y Coggins, 1968; Colgrove y cols., 1969; Konno y cols., 1971a; Konno y cols., 1972; Mebus y cols., 1983). En la PPA aguda se describe una degeneración difusa de los linfocitos con necrosis de los centros germinativos y vainas linfoides periarteriales, infiltración en estas zonas de eritrocitos y cambios degenerativos de las paredes vasculares, siendo incluso más acentuados estos fenómenos en las fases subagudas (Maurer y cols., 1958; Moulton y Coggins, 1968; Konno y cols., 1972; Nunes Petisca y Martins Gonçalves, 1976; Mebus y Dardiri, 1979; Sánchez Botija, 1980; Mebus, 1987). Las alteraciones del tejido linfoide en la fase crónica fueron muy variables dependiendo de la duración y la gravedad de la infección (Konno y cols., 1972; Sierra y cols., 1993) en general, es escasa la atrofia folicular y la presencia de linfocitos degenerados.

La pulpa esplénica roja se describe como hiperémica o hemorrágica (Moulton y Coggins, 1968; Konno y cols., 1971a; Konno y cols., 1972; Sierra y cols., 1993). Las vainas de

Schweigger-Seidel se hacen indistinguibles, presentándose hialinizadas o desprendidas a causa de la hemorragia y/o el edema conteniendo abundantes células degeneradas y restos celulares (Maurer y cols., 1958; Moulton y Coggins, 1968; Konno y cols., 1971a; Konno y cols., 1972; Nunes Petisca y Martins Gonçalves, 1976; Mebus y cols., 1983; Mebus, 1988). También se ha observado la presencia de material fibrinoide PAS positivo en las vainas, así como fibras colágenas y reticulares distendidas por el edema y una proliferación celular que conduce a una red capilar afuncional lo que provoca el acúmulo de sangre en estas áreas (Maurer y cols., 1958; Moulton y Coggins, 1968; Konno y cols., 1972).

Los macrófagos y células reticulares de la pulpa esplénica roja, zona marginal de las vainas linfoides periarteriales y las vainas macrofágicas, constituyen una población de células blanco del VPPA observándose en distintas fases de degeneración y necrosis, en donde las lesiones se hacen más patentes (Maurer y cols., 1958; Moulton y Coggins, 1968; Colgrove y cols., 1969; Konno y cols., 1971a; Konno y cols., 1972; Mebus y Dardiri, 1979; Mebus y cols., 1983; McDaniel, 1986; Mebus, 1987; Fernández y cols., 1992a, Fernández y cols., 1992b).

En bazos de cerdos infectados con aislados atenuados se ha descrito la proliferación e infiltración de células reticuloendoteliales y células redondas basófilas (Moulton y Coggins, 1968; Konno y cols., 1972; Hess, 1981; Mebus, 1987; Wilkinson, 1989; Sánchez-Vizcaíno, 1992) proliferando entre las fibras reticulares expandidas del estroma esplénico (Moulton y Coggins, 1968; Konno y cols., 1971a; Konno y cols., 1972). Igualmente es frecuente la observación de acúmulos de células mieloides (Konno y cols., 1971a; Konno y cols., 1972; Mebus y cols., 1983; Mebus, 1987).

La utilización de la inmunofluorescencia en la PPA ha demostrado la presencia de antígeno vírico a partir de las 36 hpi en macrófagos y células reticulares de las áreas marginales y en la pulpa esplénica roja (Boulanger y cols., 1967; Bool y cols., 1969; Colgrove y cols., 1969; Dardiri y Hess, 1970; Mebus, 1988; Pan, 1989), considerándose el bazo como el órgano de elección para la detección antigénica dada la abundante fluorescencia en las últimas fases de la infección.

En estudios de bazos incluidos en parafina y mediante técnicas de inmunoperoxidasa, se

localizó el antígeno vírico en macrófagos libres y fijos de pulpa esplénica roja desde los 3 dpi y, en menor medida, en macrófagos de pulpa esplénica blanca tanto con el aislado E70 como con el E75 (Fernández y cols., 1991a; Fernández y cols., 1992a; Fernández y cols., 1992b). El doble marcaje, empleando marcadores de subpoblaciones linfocitarias y leucocitarias demostró que las células inmunorreactivas en bazo corresponden exclusivamente a monocito/ macrófagos (González y cols., 1985a; Mínguez y cols., 1988).

#### II.5.4. Médula Ósea.

Al igual que las tonsilas han sido escasos los estudios morfológicos (histológicos e inmunohistológicos) llevados a cabo en la médula ósea de animales afectados de PPA. En estudios histológicos desarrollados en animales infectados con el VPPA y sacrificados secuencialmente, se ha observado una drástica disminución de células hematopoyéticas en la médula ósea, así como destrucción del retículo a partir de los 7 dpi (Nunes Petisca y Martins Gonçalves, 1976).

"In vitro", se ha demostrado que el VPPA replica en cultivos de macrófagos de sangre periférica porcina (Malmquist y Hay, 1960; Wardley y Wilkinson, 1977b; Wardley y cols., 1979; Pan y cols., 1980; Casal y cols., 1984) y en macrófagos procedentes de médula ósea (Malmquist, 1963; Nunes Petisca, 1965a; Moura Nunes y cols., 1975; Wardley y Wilkinson, 1977b; Wardley y cols., 1979; Forman y cols., 1983).

Mediante técnicas de inmunofluorescencia se ha observado abundante antígeno vírico (Dardiri y Hess, 1970), presentándose éste en megacariocitos, monocitos, macrófagos (Colgrove y cols., 1969; Coggins, 1974; Edwards y cols., 1985b; Pan, 1987) y osteoclastos (Edwards y cols., 1985b).

Mediante hibridación "in situ" se ha detectado positividad en el citoplasma de células reticulares bien de forma granular y/o difusa (Galo y Nunes Petisca, 1990).

Algunos autores indican que no existe acción del virus sobre los polimorfonucleares neutrófilos "in vivo" (Wardley y Wilkinson, 1977a; Sánchez-Vizcaíno y cols., 1981); sin

embargo, el incremento de las formas juveniles (Rodríguez y cols., 1972; Wardley y Wilkinson, 1977a; Nesser y cols., 1986) que se presenta en el curso de la enfermedad es considerado como un indicio de la infección de estas células (Wardley y Wilkinson, 1977a).

Mediante inmunofluorescencia y en estudios "in vivo", un número escaso de neutrófilos mostraron positividad citoplasmática similar a la descrita en monocitos (Colgrove, 1968; Colgrove y cols., 1969), comprobándose "in vitro" un 4% de neutrófilos infectados (Casal y cols., 1984). Ultraestructuralmente se han observado centros de replicación con partículas víricas en distintos estadios de maduración en el citoplasma de un pequeño número de neutrófilos "in vitro" (Casal y cols., 1984) e "in vivo" (Gómez-Villamandos, 1988).

#### **II.5.5. Hígado.**

Las lesiones macroscópicas más frecuentemente descritas consisten en congestión de diversa intensidad (Manso Ribeiro y cols., 1958; Maurer y cols., 1958; Gracia, 1961; Mercadé, 1961; DeTray, 1963; Maurer y cols., 1964; Nunes Petisca, 1965a; Moulton y Coggins, 1968; Lucas y cols., 1970; Konno y cols., 1971a; Wilkinson y cols., 1981; Ordás y cols., 1983b; McDaniel, 1986; Sánchez-Vizcaíno, 1992). Las hemorragias varían desde difusas generalizadas (Gracia, 1961; Séculi y Costa, 1961; Wilkinson y cols., 1981) hasta petequiales (Wilkinson y cols., 1981), pasando por hemorragias subcapsulares de pequeño tamaño (Manso Ribeiro y cols., 1958; Moulton y Coggins, 1968; Wilkinson y cols., 1981; Sierra y cols., 1986). La hepatomegalia y el aumento de consistencia no son muy marcadas (Séculi y Costa, 1961; Moulton y Coggins, 1968; Castagnoli y cols., 1969; Konno y cols., 1971a; Plowright, 1980) describiéndose igualmente fenómenos degenerativos con aparición de hígados en "nuez moscada" (Nunes Petisca, 1965a; Lucas y cols., 1970; Wilkinson y cols., 1981).

Las alteraciones histopatológicas de hígados afectados por la PPA aguda o subaguda se localizan fundamentalmente en las células del SMF (células de Kupffer) (Lucas y cols., 1970; Plowright, 1980; Sanchez-Vizcaíno y Ordás, 1985; McDaniel, 1986; Sánchez-Vizcaíno, 1986a; Sierra y cols., 1986; Mebus, 1987; Mebus, 1988; Wilkinson, 1989) y en el sistema vascular (Manso Ribeiro y cols., 1958; Maurer y cols., 1958; DeTray, 1963; Moulton y Coggins, 1968;

Lucas y cols., 1970; Konno y cols., 1971a; Rodríguez y cols., 1972; Nunes Petisca y Martins Gonçalves, 1978; Arias y cols., 1986; McDaniel, 1986; Sierra y cols., 1986), junto a una desorganización de las fibras de reticulina y colágena (Lucas y cols., 1970; Konno y cols., 1971b; Nunes Petisca y Martins Gonçalves, 1978; Sánchez-Vizcaíno, 1986a). También ha sido referenciada con frecuencia, la necrosis de hepatocitos en las distintas zonas lobulillares (Maurer y cols., 1958; Maurer y cols., 1964; Lucas y cols., 1970; Konno y cols., 1971a; Arias y cols., 1986; McDaniel, 1986; Sánchez-Vizcaíno, 1986a, Sierra y cols., 1986; Mebus, 1988; Jubb y cols., 1993; Sierra y cols., 1993).

Las **lesiones vasculares** afectan principalmente a las arteriolas y los capilares sinusoidales, presentándose tumefacción endotelial (Sierra y cols., 1987; Gómez-Villamandos, 1988) y alteraciones degenerativas que llegan a la hialinización vascular (Manso Ribeiro y cols., 1958; Maurer y cols., 1958; Séculi y Costa, 1961; Castagnoli y cols., 1967; Hess, 1971; McDaniel, 1986). Como consecuencia de estas lesiones se produce un aumento de la permeabilidad vascular que origina edema, especialmente en los espacios porta y septos interlobulillares (Moulton y Coggins, 1968; Lucas y cols., 1970; Konno y cols., 1971b; Mebus y Dardiri, 1979). La congestión se localiza principalmente en sinusoides y venas centrolobulillares (Lucas y cols., 1970) y las hemorragias presentes fundamentalmente en la PPA aguda y subaguda (Séculi y Costa, 1961; Nunes Petisca y Martins Gonçalves, 1978; Mebus y Dardiri, 1979) se observan en los espacios interlobulillares (Mebus y Dardiri, 1979), asociadas en algunos casos a trombosis y necrosis isquémicas (DeTray, 1963).

Los **sinusoides** muestran masas de restos celulares resultantes de la necrosis de leucocitos circulantes, células de Kupffer, hepatocitos y células del infiltrado inflamatorio (Maurer y cols., 1958; Lucas y cols., 1970). Este fenómeno se observa desde los 6 dpi con la cepa L60 (altamente patógena) (Ruiz Martínez, 1978; Mebus, 1988) y a los 22 dpi con la cepa RDIII (Mebus, 1988).

Las **células de Kupffer** presentan fenómenos de necrosis en la PPA aguda (Lucas y cols., 1970; Konno y cols., 1971b; Mebus y Dardiri, 1979; Plowright, 1980; Mebus y cols., 1983; Arias y cols., 1986; Sierra y cols., 1986; Sierra y cols., 1987; Mebus, 1988; Fernández y cols., 1992c) habiéndose observado distintos grados de hiperplasia e hipertrofia en la PPA subaguda y crónica (Konno y cols., 1971a; Konno y cols., 1971b; Mebus y Dardiri, 1979; Sierra y cols.,

1986; Mebus, 1987; Sierra y cols., 1987; Mebus, 1988; Fernández y cols., 1992a).

Los datos morfológicos de las células de Kupffer infectadas con el aislado virulento E70 muestran, a partir de los 3 días de la inoculación, marginación periférica de la cromatina y áreas citoplasmáticas menos teñidas, que se corresponden con los centros de replicación vírica (Sierra y cols., 1987; Gómez-Villamandos, 1988). El número de estas células disminuye drásticamente a los 5 y 7 dpi aumentando el número de células que presentan replicación vírica; paralelamente a estos fenómenos se observa la aparición de replicación vírica en los hepatocitos, manifestando un efecto citopático similar al de las células de Kupffer (García-Gancedo y cols., 1974a; García-Gancedo y cols., 1974b; Sierra y cols., 1987; Gómez-Villamandos, 1988; Fernández y cols., 1992a; Fernández y cols., 1992c; Pérez, 1992).

Por otra parte y tras la inoculación de un aislado moderadamente patógeno (E75) y a los 9 dpi se observa una evidente hiperplasia de las células de Kupffer, así como un gran número de centros de replicación en estas células siendo muy manifiestos los fenómenos de hemoadsorción (Gómez-Villamandos, 1988; Sierra y cols., 1991; Fernández y cols., 1992a; Fernández y cols., 1992c; Pérez, 1992).

La necrosis de los hepatocitos suele aparecer de forma individual, aunque en las fases finales de la enfermedad puede existir acúmulos de hepatocitos necróticos (DeKock y cols., 1940; Maurer y cols., 1964; Colgrove y cols., 1969; Sierra y cols., 1986; Mebus, 1987; Sierra y cols., 1987; Gómez-Villamandos, 1988; Fernández y cols., 1992a; Fernández y cols., 1992c; Sierra y cols., 1993). La localización de los hepatocitos necróticos se presta a discusión, ya que algunos autores los localizan en la periferia del lobulillo (Jubb y cols., 1993), otros indican que se localizan preferentemente en las áreas centrolobulillares (Konno y cols., 1971b) y otros observaron una necrosis diseminada (Maurer y cols., 1958; Maurer y cols., 1964; Mebus y Dardiri, 1979). En este sentido y tras la inoculación del aislado E70 (altamente virulento), se observó una necrosis progresiva de los hepatocitos con dirección centrípeta dentro del lobulillo (Sierra y cols., 1987; Gómez-Villamandos, 1988).

El infiltrado celular inflamatorio está constituido por linfocitos de localización interlobulillar manifestando cariorrexis frecuentes (Séculi y Costa, 1961; Gómez-Villamandos,

1988; Jubb y cols., 1993). Además de linfocitos maduros, es frecuente observar algunas células redondas basófilas (células indiferenciadas linfoides y/o células plasmáticas) en el espacio periportal, existiendo también focos de macrófagos y restos celulares (Konno y cols., 1971b; Mebus y cols., 1983; Jubb y cols., 1993). Junto a las células mononucleares también se han descrito eosinófilos (Maurer y cols., 1958; Moulton y Coggins, 1968; Colgrove y cols., 1969; Konno y cols., 1971b; Mebus y Dardiri, 1979; Arias y cols., 1986; Gómez-Villamandos, 1988), y células plasmáticas, aunque en escaso número (Maurer y cols., 1958; Maurer y cols., 1964). Todos los autores consultados coinciden en la necrosis de las células mononucleares del infiltrado como carácter histológico constante en la PPA a nivel hepático (Nunes Petisca, 1965a; Colgrove y cols., 1969; Konno y cols., 1971a; Konno y cols., 1971b; Rodríguez y cols., 1972; Nunes Petisca y Martins Gonçalves, 1978; Ruiz Martínez, 1978; Sierra y cols., 1986; Mebus, 1987; Sierra y cols., 1987; Gómez-Villamandos, 1988; Mebus, 1988). Aunque para algunos estas células en necrosis corresponden a linfocitos (DeKock y cols., 1940; Falcón y Núñez, 1960; Maurer y cols., 1964; Rodríguez y cols., 1972), la mayoría considera que los monocitos son las células predominantes y que más tempranamente constituyen el infiltrado celular (Moulton y Coggins, 1968).

El hígado es uno de los órganos en los que se han detectado altos títulos de virus a partir de las 24 hpi, considerándose como un órgano de replicación vírica secundaria (Heuschele y cols., 1966; Heuschele, 1967; Plowright, 1980). Así, se han observado altas concentraciones de antígeno en hígados de animales inoculados con aislados virulentos, pero no con aislados atenuados (Coggins, 1974; Mebus y cols., 1983).

Mediante estudios con inmunofluorescencia se ha demostrado que el VPPA presenta especial afinidad por las células macrofágicas del hígado (Bool y cols., 1969; Sánchez Botija, 1980; Mebus, 1987; Pan, 1987; Mebus, 1988) habiéndose demostrado antígeno vírico en ellas así como en hepatocitos, a veces en forma de cuerpo de inclusión (Bool y cols., 1969; Colgrove y cols., 1969; Coggins, 1974; Mebus, 1987). En cerdos jóvenes infectados experimentalmente vía oral se observó inmunofluorescencia en células mononucleares y células endoteliales de los sinusoides hepáticos (Colgrove y cols., 1969).

Mediante técnicas de inmunoperoxidasa sobre cortes de hígados infectados con el aislado

E70, se ha observado antígeno vírico en células de Kupffer y monocitos circulantes a los 3 dpi incrementándose su número a los 7 dpi y localizándose en macrófagos intersticiales, hepatocitos, células endoteliales y epitelio biliar (Sierra y cols., 1990b; Fernández y cols., 1992a; Fernández y cols., 1992c; Pérez, 1992). En cerdos infectados con el aislado E75 la inmunorreactividad a partir de los 9 dpi se localizó en estas mismas células excepto en las células endoteliales sinusoidales y epitelio biliar (Fernández y cols., 1990; Pérez y cols., 1990; Fernández y cols., 1991a; Fernández y cols., 1992a; Fernández y cols., 1992c; Pérez, 1992). La positividad se describió de forma bien difusa distribuida por todo el citoplasma o bien globular en las zonas que, ultraestructuralmente se describen como centros de replicación. En las células de Kupffer, monocitos y macrófagos intersticiales en necrosis, ha sido puesta de manifiesto la presencia intracitoplasmática de IgM, IgG y C1q en cerdos infectados con ambos aislados E70 y E75 (Fernández y cols., 1991b; Fernández y cols., 1992c; Pérez, 1992).

En el único trabajo realizado con técnicas de hibridación "in situ" la inmunorreactividad en el hígado se ha detectado en el citoplasma de hepatocitos y de células de Kupffer (Galo y Nunes Petisca, 1990).

El empleo del microscopio electrónico sobre cortes de hígados infectados con el aislado E70 evidenció la replicación del virus en células de Kupffer, monocitos, histiocitos y hepatocitos, demostrándose la replicación viral próxima al núcleo, en zonas de escasa electrodensidad, libre de organoides citoplasmáticos y rodeadas de mitocondrias y de complejo de Golgi (Sierra y cols., 1987; Gómez-Villamandos, 1988; Sierra y cols., 1990b; Fernández y cols., 1992b; Carrasco y cols., 1992). En el interior de estas áreas se observan partículas víricas en diferentes estados de maduración así como estructuras membranosas (Sierra y cols., 1987). La replicación vírica en hepatocitos se ha observado principalmente en los estadios finales de la enfermedad y producida por aislados altamente virulentos (Sierra y cols., 1987; Gómez Villamandos, 1988).



### II.5.6. Pulmón.

Las lesiones macroscópicas pulmonares en la forma aguda y subaguda de la PPA varían, dependiendo de la virulencia del aislado vírico implicado en la infección. Las hemorragias de distinto tamaño distribuidas de forma difusa (Maurer y cols., 1958; Maurer y cols., 1964; Plowright, 1980; Sánchez Botija, 1980; McDaniel, 1986; Jubb y cols., 1993), congestión y edema (Manso Ribeiro y cols., 1958; Maurer y cols., 1958; Moulton y Coggins, 1968; Lucas y cols., 1970; Hess, 1971; Konno y cols., 1971a; Sánchez Botija, 1980; Hess, 1981; Slauson y Sánchez-Vizcaíno, 1981; Wilkinson y cols., 1981; Ordás y Marcotegui, 1985; McDaniel, 1986; Sierra y cols., 1986; Terpstra, 1987; Mebus, 1988; Wilkinson, 1989; Sánchez-Vizcaíno, 1992; Jubb y cols., 1993), asociadas al engrosamiento de los tabiques septales e interlobulillares (Montgomery, 1921; Moulton y Coggins, 1968; Lucas y cols., 1970; Pan y cols., 1975; Plowright, 1980; Sánchez Botija, 1980; McDaniel, 1986; Mebus, 1988; Jubb y cols., 1993) y la hepatización, principalmente de los lóbulos apical y cardíaco constituyen las lesiones pulmonares que con mayor frecuencia se han encontrado en cerdos infectados con el VPPA (Maurer y cols., 1958; Castagnoli y cols., 1967, Lucas y cols., 1970; Hess, 1981; Ekue y cols., 1989). En algunas ocasiones el pulmón presenta un aspecto pálido y jaspeado en los casos en los que se presenta una neumonitis difusa (Hess, 1981; Hess, 1983).

En la forma crónica, las lesiones pulmonares más características consisten en una pleuritis fibrinosa (Montgomery, 1921; DeTray, 1957; Moulton y Coggins, 1968; Lucas y cols., 1970; Sánchez Botija, 1980; Hess, 1981; Hess, 1983; Wardley y cols., 1983; Mebus, 1988) y una neumonía con frecuencia necrotizante (Nunes Petisca, 1965b; Pan y cols., 1975; Mebus y Dardiri, 1979; Mebus y Dardiri, 1980; Plowright, 1980; Hess, 1981; Wilkinson y cols., 1981; Sánchez Botija, 1982; McDaniel, 1986; Sierra y cols., 1986; Mebus, 1988; Sierra y cols., 1993) que puede mostrar calcificaciones distróficas (Moulton y cols., 1975; Hess, 1981; Hess, 1983; Sánchez-Vizcaíno, 1986a).

Las lesiones histopatológicas del pulmón en las formas agudas y subagudas consisten en congestión, edema, hemorragias, descamación epitelial e infiltrado peri y endobronquial de células redondas en su mayoría en necrosis (Moulton y Coggins, 1968; Colgrove y cols., 1969; Konno y cols., 1971a; Mebus y Dardiri, 1979). Los septos interalveolares están ligeramente engrosados

con abundantes células mononucleares (Colgrove y cols., 1969; Moulton y cols., 1975; Slauson y Sánchez-Vizcaíno, 1981; Sierra y cols., 1986; Sierra y cols., 1993) y los capilares septales aparecen dilatados con numerosas células del SMF, así como células linfoides (Konno y cols., 1971a).

En las formas crónicas, la pleura presenta un engrosamiento causado por la edematización y la presencia de un tejido de granulación congestivo que prolifera sobre un exudado previo rico en fibrina junto al que se pueden observar células mononucleares, neutrófilos y eosinófilos (Moulton y cols., 1975; Mebus y Dardiri, 1979; Sánchez Botija, 1980; Sierra y cols., 1986; Sierra y cols., 1993). En el parénquima pulmonar se describe una neumonitis difusa con abundantes células mononucleares localizadas en las zonas perivasculares, peribronquiales y en los septos alveolares, los cuales aparecen muy engrosados (Moulton y Coggins, 1968; Moulton y cols., 1975; Mebus y Dardiri, 1979; Sánchez Botija, 1980; Hess, 1987a). Los alvéolos, bronquios y bronquiolos se encuentran repletos de neutrófilos y macrófagos (Nunes Petisca, 1965b; Moulton y cols., 1975; Mebus y Dardiri, 1979) o sólo de células mononucleares y epiteliales descamadas (Moulton y cols., 1968; Moulton y cols., 1975; Pan y cols., 1975) observándose fibrina en las lesiones más graves que evolucionan a una necrosis de los alvéolos (Moulton y cols., 1975).

Estos infiltrados pueden experimentar necrosis, pudiendo afectar a los septos alveolares extendiéndose entonces en dirección centrífuga, afectando al resto del parénquima pulmonar (Maurer y cols., 1958; Moulton y Coggins, 1968; Moulton y cols., 1975; Pan y cols., 1975; Sánchez Botija, 1980). Posteriormente estos focos de necrosis son encapsulados por tejido conectivo (Moulton y cols., 1975; Pan y cols., 1975; Mebus y Dardiri, 1979; Hess, 1981), presentando las zonas limítrofes un infiltrado inflamatorio mixto (Moulton y Coggins, 1968; Mebus y Dardiri, 1979), congestión y enfisema vicariante de las zonas menos afectadas (Sánchez Botija, 1980) así como hiperplasia del tejido linfoide asociado a bronquios (Mebus y Dardiri, 1979).

Mediante técnicas de inmunofluorescencia se han detectado antígenos virales en forma de cuerpo de inclusión o granulaciones difusas en el citoplasma de macrófagos septales y alveolares así como en células epiteliales, células endoteliales de los capilares septales y detritus celulares

de los septos y alvéolos (Boulanger y cols., 1967; Bool y cols., 1969; Colgrove y cols., 1969; Pan y cols., 1975; Pan, 1987; , Mebus, 1988). En pulmones con lesiones neumónicas de curso crónico se demostró la existencia de antígeno vírico, IgG, complemento y fibrina en los alvéolos, septos alveolares y paredes vasculares (Pan y cols., 1975), y en algunos casos, macrófagos alveolares con cuerpos de inclusión víricos en el citoplasma presentaron también fluorescencia frente a IgG y complemento, indicando la presencia de complejos antígeno-anticuerpo-complemento en el interior de los macrófagos (Pan y cols., 1975). Estos datos han sido interpretados como indicadores del desarrollo de lesiones inmunopatológicas en la PPA crónica (Moulton y Coggins, 1968; Coggins, 1974; Pan y cols., 1975; Bertram, 1986; Mims, 1987; Bertram y cols., 1989).

La aplicación de técnicas de inmunoperoxidasa sobre tejidos de cerdos infectados con el aislado E70, ha demostrado la presencia de antígeno vírico, a partir de los 3 dpi, en monocitos y macrófagos intravasculares pulmonares (MIPs). Además a los 5 dpi fue detectado en macrófagos intersticiales y neutrófilos intravasculares (Fernández y cols., 1990; Fernández y cols., 1991a; Fernández y cols., 1992a, Fernández y cols., 1992b; Fernández y cols., 1992c; Pérez, 1992). Con un aislado menos patógeno (E75), y a partir de los 9 dpi, la inmunorreacción específica se demostró en las mismas células y en macrófagos alveolares. Algunas células inmunorreactivas para el antígeno vírico presentaron simultáneamente IgM, IgG y C1q de forma granular difusa o bien restringida a un área redondeada del citoplasma a partir de los 5 dpi (Fernández y cols., 1991b; Fernández y cols., 1992c; Pérez, 1992). Estos resultados indicarían la presencia de inmunocomplejos, los cuales podrían activar y estimular la capacidad de fagocitosis de los macrófagos intravasculares a los 5 y 7 dpi (Smith y cols., 1986; Mims, 1987) provocando una mayor producción y secreción de sustancias vasoactivas mediadoras de los mecanismos circulatorios que participan en la producción del edema alveolar (Bertram, 1986, Bertram y cols., 1989; Fernández y cols., 1992c) característico de la PPA aguda. En cambio, en las lesiones pulmonares subagudas los inmunocomplejos observados a los 12 dpi fueron detectados en macrófagos alveolares con signos degenerativos y asociados a linfocitos, macrófagos y neutrófilos, lo que puede representar morfológicamente mecanismos de destrucción celular inmunomediados (Fernández y cols., 1992c).

Mediante técnicas de hibridación "in situ", se ha observado material genético vírico a nivel

de epitelio alveolar, bronquial y en macrófagos del exudado inflamatorio (Galo y Nunes Petisca, 1990).

Los trabajos ultraestructurales de pulmones infectados con el aislado E70 demostraron un aumento del número de MIPs a los 3 y 5 dpi, en contraste con la disminución de células de Kupffer destruidas en estos estadíos (Carrasco, 1988), lo que sugiere un comportamiento diferente en la interacción virus-célula en cada órgano (Pan, 1987; Carrasco, 1988). Los MIPs y, secundariamente los monocitos circulantes, son las células que presentan replicación vírica en mayor proporción a nivel pulmonar con este aislado, aumentando con los dpi el número de células y restos celulares que contienen virus (Carrasco, 1988; Sierra y cols., 1990a; Carrasco y cols., 1992; Fernández y cols., 1992b).

En los animales inoculados con el aislado E75 se observó una intensa participación de los MIPs, si bien, la destrucción celular es menor en relación al aislado altamente virulento. A partir de los 11 dpi decrece el número de estas células y aparecen procesos neumónicos focales con presencia de abundantes macrófagos alveolares en los que, en una alta proporción, se observa replicación vírica lo que justificaría la eliminación aerógena del virus (Carrasco, 1988; Sierra y cols., 1990a).

### **II.5.7. Riñón.**

La lesión renal más característica de la PPA consiste en la presencia de hemorragias petequiales localizadas principalmente a nivel cortical (Maurer y cols., 1958; Falcón y Núñez, 1960; Séculi y Costa, 1961; DeTray, 1963; Nunes Petisca, 1965b; Castagnoli y cols., 1967; Moulton y Coggins, 1968; Castagnoli, 1969; Dardiri y Hess, 1970; Hess, 1971; Rodríguez y cols., 1972; Gayot y cols., 1974; Ruiz Martínez, 1978; Plowright, 1980; Wilkinson y cols., 1981; Sánchez Botija, 1982; Schlafer y Mebus, 1984a; McDaniel, 1986; Sierra y cols., 1986; Mebus, 1987; Topley, 1990). En la zona medular también se describen con frecuencia hemorragias en los cálices (Maurer y cols., 1958; Falcón y Núñez, 1960; Moulton y Coggins, 1968) y alrededor de la pelvis (Nunes Petisca, 1965b; Castagnoli, 1969; Mebus y Dardiri, 1979; Plowright, 1980; McDaniel, 1986; Sierra y cols., 1986; Mebus, 1988; Sánchez-Vizcaíno, 1992;

Sierra y cols., 1993), siendo muy característico la colección de sangre dentro de la pelvis renal (Castagnoli y cols., 1967; Rodríguez y cols., 1972; Gayot y cols., 1974; McDaniel, 1986).

Histológicamente y a nivel glomerular, los capilares presentan detritus celulares circulantes (García e Costa y Alves de Matos, 1980; Quezada, 1988; Sierra y cols., 1989; Fernández y cols., 1992a) o pueden estar ocluidos por microtrombos (Maurer y cols., 1958; Konno y cols., 1971a; Quezada, 1988; Quezada y cols., 1989; Sierra y cols., 1989; Martín-Fernández y cols., 1991; Sierra y cols., 1993). La barrera de filtración glomerular está precozmente afectada, existiendo una pequeña cantidad de sangre o líquido proteináceo en la cápsula de Bowman (Maurer y cols., 1958; Moulton y Coggins, 1968; Nunes Petisca y Martins Gonçalves, 1978; Martín-Fernández y cols., 1991). Al final de la enfermedad aguda, los glomérulos presentan hialinización y engrosamiento PAS positivo de las membranas basales así como una infiltración inflamatoria muy escasa (Nunes Petisca, 1965b; Moulton y Coggins, 1968; Nunes Petisca y Martins Gonçalves, 1978; Martín-Fernández y cols., 1991) pudiendo por el contrario desarrollarse, en las formas crónicas, glomerulonefritis proliferativas, con hiperplasia de células mesangiales y engrosamiento de la cápsula de Bowman (Nunes Petisca, 1965a; Nunes Petisca, 1965b; Sánchez Botija, 1980; Sierra y cols., 1986; Martín-Fernández y cols., 1991).

Una congestión vascular y múltiples hemorragias de distinta intensidad con destrucción del sistema tubular que se encuentra a estos niveles son frecuentes en las zonas cortico-medulares (Nunes Petisca, 1965b; Lucas y cols., 1970; Konno y cols., 1971a; Mebus y Ruiz Martínez, 1978; Dardiri, 1979; Martín-Fernández y cols., 1991). En las primeras fases de la infección los túbulos muestran lesiones degenerativas con destrucción de la parte apical de las células epiteliales evolucionando hacia la destrucción del cuerpo celular y desprendimiento de la membrana basal (Nunes Petisca y Martins Gonçalves, 1978). A los 7 dpi se observa una necrosis tubular difusa con la presencia en el interior de los túbulos de masas hialinas o cilindros granulados PAS positivos (Maurer y cols., 1958; Moulton y Coggins, 1968; Colgrove y cols., 1969; Konno y cols., 1971a; Nunes Petisca y Martins Gonçalves, 1978; Mebus y Dardiri, 1979; Tepstra, 1987) configurando lesiones tubulotóxicas (Maurer y cols., 1958).

En el intersticio renal destacan las lesiones vasculares de distinta intensidad que serían las causantes del edema, hemorragias, trombosis e infartos (Maurer y cols., 1958; Moulton y

Coggins, 1968; Sierra y cols., 1986; Quezada, 1988; Sierra y cols., 1989; Fernández y cols., 1992a). Independientemente del aislado, a partir de los 7 dpi se produce una infiltración de células mononucleares (Colgrove y cols., 1969; Nunes Petisca y Martins Gonçalves, 1978; Mebus y Dardiri, 1979), reconocidas como células reticuloendoteliales, células redondas basófilas, que probablemente corresponden a células indiferenciadas linfoplasmocitarias (Konno y cols., 1971a; García e Costa y Alves de Matos, 1980; Martín-Fernández y cols., 1991); estas proliferaciones son mayores en las formas crónicas en las que destaca una nefritis intersticial multifocal (Nunes Petisca, 1965a; Sierra y cols., 1986).

En el riñón y, aplicando la técnica de la inmunofluorescencia se han observado escasas cantidades de antígeno vírico, coincidiendo con un sistema mononuclear fagocítico poco desarrollado en este órgano (Boulanger y cols., 1966; Boulanger y cols., 1967; Bool y cols., 1969; Colgrove y cols., 1969; Dardiri y Hess, 1970; Coggins, 1974; Pan, 1987). La positividad se ha detectado en macrófagos intersticiales (Bool y cols., 1969; Colgrove y cols., 1969; Pan, 1987; Mebus, 1988), glomérulos (Boulanger y cols., 1966; Boulanger y cols., 1967; Bool y cols., 1969; Mebus, 1988), microtrombos, células mesangiales, monocitos y células del epitelio tubular (Pan, 1987). En cursos subagudos y crónicos la fluorescencia específica se ha observado en las paredes de los capilares glomerulares y en el mesangio conjuntamente con fibrina, IgG y C3 (Slauson y Sánchez-Vizcaíno, 1981; Martín-Fernández y cols., 1991), lo que sugiere la participación de fenómenos de hipersensibilidad en el desarrollo de la glomerulonefritis característica en estas formas de la enfermedad.

Mediante técnicas de inmunoperoxidasa se ha observado antígeno vírico en células mesangiales, monocitos y macrófagos intersticiales, células endoteliales y células del epitelio tubular a los 7 dpi con el aislado E70 (Fernández y cols., 1991a; Fernández y cols., 1992a) y en macrófagos y monocitos de glomérulos e intersticio a los 9 dpi con el aislado E75, no encontrándose inmunorreactividad en este órgano a los 11 y 12 dpi (Fernández y cols., 1991a; Fernández y cols., 1992a).

Los estudios de microscopía electrónica resaltan los fenómenos degenerativos tubulares, replicación en monocitos a partir de los 5 y 7 dpi, así como en macrófagos intersticiales y células endoteliales de los capilares intertubulares en las lesiones renales agudas con el aislado E70

(Quezada, 1988; Sierra y cols., 1989), observándose coagulación intravascular en los capilares glomerulares e intertubulares a partir de los 9 dpi conjuntamente con cambios degenerativos tubulares e infiltración intersticial de macrófagos y linfocitos con el aislado moderadamente virulento E75 (Quezada, 1988; Quezada y cols., 1989; Sierra y cols., 1989).

## II.6. INMUNOLOGÍA DE LA PPA.

El tropismo primario del virus de la PPA por las células del SMF es un factor que se considera muy importante en el desarrollo de la respuesta inmunológica frente al virus, pudiendo variar ésta según la capacidad patógena del aislado viral implicado (Mebus, 1988).

En cerdos infectados con aislados víricos muy patógenos se ha demostrado que muchas células, implicadas en el desarrollo de una respuesta inmune son destruidas y prácticamente desaparecen, tanto por la acción directa de la replicación del virus, como a través de mecanismos indirectos. En este sentido, se ha propuesto que la replicación del virus en células presentadoras de antígeno del SMF limita la respuesta inmunológica normal (Coggins, 1974; Pierce, 1980; Mebus y cols., 1983; González, 1985a; Pan y Hess, 1985; Lawman y cols., 1987; Mebus, 1987; Pan, 1987; González y cols., 1989).

Así, los virus muy virulentos (E70, L60) no permitirían el desarrollo de la respuesta inmune, al destruir de forma rápida el SMF, en cambio, los virus menos patógenos (E75, RD) establecen un infección con una menor destrucción de estos elementos (Wardley y cols., 1979; Mebus y cols., 1983; Mebus, 1988) permitiendo una respuesta inmunológica temprana que participaría posteriormente en las reacciones inmunopatológicas (Pan y cols., 1975). En este sentido, se ha señalado que en la forma aguda de PPA, cuando la muerte ocurre antes de los 11 dpi, los cerdos mueren por una destrucción rápida y sistémica del SMF, mientras que en la muerte que ocurre después de los 13 dpi se debería a fenómenos inmunopatológicos desencadenantes de las "muertes inmunológicas" (Pan y cols., 1975; Pan y Hess, 1985).

Estas diferencias en la interacción entre los distintos aislados y los monocito/ macrófagos han sido observadas también "in vitro". En cultivos de monocitos infectados con VPPA virulento existe un alto grado de infección, así como una completa destrucción a partir del segundo y tercer dpi (Wardley y Wilkinson, 1977b; Forman y cols., 1983; Casal cols., 1984). Sin embargo, los cultivos de macrófagos infectados con estos aislados mostraron un bajo nivel de infección, sobreviviendo muchos de ellos a la acción del virus.

La utilización de cultivos de macrófagos infectados con aislados víricos virulentos y atenuados permitió determinar que el ciclo de infección con ambos aislados es distinto; así mientras los aislados atenuados producen un menor efecto citopático con el establecimiento de una infección productiva eficaz, los aislados virulentos se caracterizan por la producción de un ciclo lítico con una menor producción vírica (Wardley y cols., 1979). En este sentido, hay que tener en cuenta que el crecimiento vírico en macrófagos no es la única característica que determina la virulencia "in vivo". Por otra parte, se deduce que el macrófago puede ser uno de los tipos celulares implicados en la persistencia del virus en el cerdo (Enjuanes y cols., 1977; Wardley y Wilkinson, 1977b; Wardley y cols., 1979); mecanismo en el cual, según algunos autores, podría intervenir el interferon (Kim, 1987; Esparza y cols., 1988), si bien otros autores no detectaron la influencia del interferon en la persistencia vírica en macrófagos utilizando aislados virulentos y atenuados (Wardley y cols., 1979).

Otro de los mecanismos que se ve modificado en la infección por el VPPA es la actividad fagocítica de los macrófagos. Así, se ha observado que esta actividad disminuye progresivamente hasta el octavo dpi, tanto con la cepa virulenta Lisboa 60 (L60) (Mebus y Gregg, 1985) como con la cepa atenuada República Dominicana (RD II), sin embargo, a partir de este momento existen diferencias entre ambos aislados; los cerdos infectados con la cepa L60 no recobran la actividad fagocítica y mueren al noveno dpi, mientras que los infectados con la cepa RD II recuperan esta actividad (Mebus y Gregg, 1985; Mebus, 1988). También el aislado E75 induce una disminución simultánea de la fagocitosis y de la liberación de fosfatasa ácida, funciones que retornan hacia la quinta semana a los niveles normales (Sánchez-Vizcaíno y cols., 1981). Otras funciones de los macrófagos que disminuyen tras la infección por VPPA son la quimiotaxis y la respiración oxidativa (Lawman y cols., 1987).



Además de la destrucción de los monocitos y macrófagos, los linfocitos disminuyen en las infecciones por el VPPA (Rodríguez, 1972; Sánchez-Vizcaíno y cols., 1981; Knudsen y Genovesi, 1987a; Genovesi y cols., 1988), lo que repercute sobre la respuesta inmune y parece depender de la virulencia del aislado (Wardley y Wilkinson, 1980a; Sánchez-Vizcaíno y cols., 1981; Sánchez-Vizcaíno y cols., 1983a).

Aunque en escasas ocasiones, se ha señalado que el virus replica tanto "in vivo" como "in vitro" en los linfocitos porcinos (Nunes Petisca y Martins Gonçalves, 1976; Wardley y cols., 1977c; Sánchez Botija, 1980; McDaniel, 1986). Este fenómeno se ha demostrado "in vitro", en cultivos de linfocitos porcinos (Wardley y cols., 1977c; Wardley, 1982), en cultivos de células CTLL y TC-6 de bovino, y en cultivos mixtos de linfocitos y células renales de cerdo (Ruiz Gonzalvo y cols., 1966; Takamatsu y cols., 1987), e "in vivo" a través de la observación de un anillo fluorescente rodeando al núcleo de algunos linfocitos en animales infectados (Colgrove, 1968; Colgrove y cols., 1969).

En estudios "in vivo" e "in vitro" tras infección con cepas VPPA de moderada virulencia, se observó que ni los linfocitos T, ni los B, presentaban inhibición de la capacidad de proliferación tras ser estimulados con agentes mitogénicos. Estos resultados indican que en infecciones con aislados de moderada virulencia no existe inmunosupresión, ni del sistema inmune celular ni del humoral (William y cols., 1976; Shimizu y cols., 1977; Knudsen y Genovesi, 1987a; Scholl y cols., 1989; Canals y cols., 1992; Revilla y cols., 1992); sin embargo, otros autores han observado una disminución en la capacidad de procesar el antígeno en los macrófagos infectados (Wardley y cols., 1979; Mebus y Gregg, 1985; Martins, 1987; González y cols., 1989; González Jurrero y cols., 1992a; González Jurrero y cols., 1992b).

Utilizando aislados de alta virulencia y en estudios "in vivo" se observó una disminución de la mitogénesis de linfocitos T, por lo que parece que la capacidad para producir inmunosupresión depende de la virulencia de la cepa (Sánchez-Vizcaíno y cols., 1981; Sánchez-Vizcaíno y cols., 1983a). Por otra parte, monoquinas producidas por monocitos infectados produjeron una supresión en la blastogénesis de linfocitos T y B "in vitro" (Wardley y Wilkinson, 1980a; Sánchez-Vizcaíno y cols., 1981; Wardley, 1982; Passalacqua y cols., 1988).

También existen discrepancias sobre qué tipo de linfocitos son los más afectados; así, mientras que algunos autores señalan que son los linfocitos B (Wardley y Wilkinson, 1977a; Wardley y Wilkinson, 1980a), para otros serían los linfocitos T (Sánchez Botija, 1980; Sánchez-Vizcaíno y cols., 1981; Sánchez-Vizcaíno y Ordás, 1985; Sánchez-Vizcaíno y Ordás, 1986b). La ausencia de correlación entre la función y el número de los linfocitos T y los títulos de anticuerpos relativamente altos se debería a que estos anticuerpos fueron producidos en respuesta a antígenos víricos T independientes (Sánchez-Vizcaíno y cols., 1981), explicándose de esta forma el que pueda desarrollarse una respuesta humoral desde las primeras semanas después de la infección.

Mediante microscopía electrónica y en estudios "in vitro", se ha demostrado la presencia de partículas víricas maduras dentro de los linfocitos. A las 24 hpi hay una alta proporción de células en degeneración y necrosis, la cual se incrementa con el tiempo. El virus ha sido observado junto a restos de membranas y células en degeneración, y también en agrupaciones de partículas víricas en células menos degeneradas (Wardley y cols., 1977c).

Esta acción directa del virus podría explicar la disminución del número de linfocitos (Maurer y cols., 1958; Wardley y Wilkinson, 1977a), pero no existe proporción entre el número de linfocitos con antígeno vírico y el de linfocitos en necrosis. Por el contrario, otros autores señalan que los linfocitos son las células menos afectadas por el virus, pudiendo serlo únicamente en los últimos estadios de la enfermedad (Boulanger y cols., 1966; Moulton y Coggins, 1968; Colgrove y cols., 1969; Plowright, 1980).

La respuesta humoral en cerdos enfermos de PPA es muy temprana, detectándose anticuerpos anti-VPPA del isotipo IgM a partir de los 3-4 dpi medidos mediante RIA (Wardley y Wilkinson, 1980b) y ELISA (Hamdy y Dardiri, 1980; Hamdy y cols., 1981; Forman y cols., 1982; Sánchez-Vizcaíno y cols., 1983b; Sánchez-Vizcaíno y Ordás, 1986b; Pastor y cols., 1990; Arias y cols., 1993). A los 5 dpi se han detectado mediante inmunoperoxidasa en cultivos (Wensvoort y cols., 1988) alcanzando niveles altos a los 14 dpi (Hamdy y Dardiri, 1980; Hamdy y cols., 1981; Wensvoort y cols., 1988) y descendiendo a partir de los 21 dpi con desaparición a los 30 dpi después de la infección experimental (Hamdy y Dardiri, 1980).

Los anticuerpos del isotipo IgG anti-VPPA se detectan desde los 6-10 dpi (Mebus y cols., 1983; Sánchez-Vizcaíno y cols., 1983b; Mebus, 1987; Wensvoort y cols., 1988) y persisten al menos durante 10 meses (Hamdy y Dardiri, 1980). Estos anticuerpos han sido detectados a partir de los 7 dpi por el método de la fijación del complemento, inmunoprecipitación e inmunofluorescencia (Cowan, 1963; Coggins y Heuschele, 1966; Coggins, 1974; William y cols., 1976).

A pesar de la existencia de anticuerpos específicos anti-VPPA (Hess, 1971; Hess, 1981; Casal y cols., 1987), no hay evidencias de que éstos sean capaces de neutralizar la capacidad de infección del virus (DeTray, 1957; DeTray, 1963; DeBoer, 1967; Stone y Hess, 1967; DeBoer y cols., 1969; William y cols., 1976; Viñuela, 1985; Casal y cols., 1987; Lunney, 1987), coexistiendo la viremia con la presencia de anticuerpos durante todo el curso de la enfermedad aguda (Hess, 1971; DeBoer y cols., 1972; Sánchez-Vizcaíno y cols., 1981; Mebus, 1988). Aunque no existen anticuerpos neutralizantes, los cerdos infectados con aislados de baja virulencia pueden recuperarse o progresar hacia una enfermedad crónica.

La ausencia de la capacidad neutralizante de los anticuerpos anti-VPPA es un fenómeno aún no aclarado, pudiendo deberse a la localización intracelular del virus, a la escasa producción de anticuerpos realmente neutralizantes o bien, a la heterogeneidad de las estructuras antigénicas existentes en poblaciones víricas mixtas (Pan y cols., 1970; DeBoer y cols., 1972; Pan y Hess, 1985; Pan y cols., 1988).

El papel del sistema inmune en la patogenia de la enfermedad aguda es complejo y no está todavía totalmente establecido (Alonso, 1987; Wilkinson, 1989). Dada la ausencia de anticuerpos neutralizantes, la función de los anticuerpos y de otros mecanismos efectores han sido estudiados por varios grupos de investigación; en este sentido exponemos a continuación algunos datos sobre los mismos:

#### *Inmunidad frente al virus.*

Los anticuerpos procedentes del suero de animales convalecientes, administrados pasivamente pueden reducir el nivel de replicación de virus homólogos en infecciones "in vitro"

---

(Ruiz Gonzalvo y cols., 1986a; Ruiz Gonzalvo y cols., 1986b; Ruiz Gonzalvo y cols., 1987), y disminuyen "in vivo" la gravedad de la enfermedad en cerdos infectados con aislados homólogos virulentos (Hess, 1971; Schlafer y cols., 1984b; Wardley y cols., 1985).

*Citolisis mediada por células dependientes de anticuerpos (CCDA).*

Los anticuerpos implicados en este fenómeno (Forman y cols., 1982; Norley y Wardley, 1983b; Wardley y cols., 1985; Lunney, 1987; Schultz y cols., 1987), están presentes desde los 13 dpi siendo los neutrófilos las células efectoras. Esta reacción de CCDA reduce la cantidad de virus en las células infectadas "in vitro", pero "in vivo" los cerdos con enfermedad aguda mueren probablemente antes de que estos anticuerpos estén presentes (Norley y Wardley, 1983b; Wardley y cols., 1985).

*Citolisis mediada por complemento.*

Los anticuerpos unidos a los antígenos de la superficie de las células infectadas pueden detectarse a partir de los 5-7 días después de la inoculación con virus virulento. Los anticuerpos fijadores de complemento aparecen a los 14-15 dpi; por lo que es probable que aparezcan demasiado tarde para prevenir la destrucción celular y la liberación de grandes cantidades de virus en infecciones con aislados altamente virulentos (William y cols., 1976; Norley y Wardley, 1982; Wardley y cols., 1985). Este fenómeno parece tener una especificidad significativa ya que no necesariamente produce la lisis de células infectadas por otros aislados víricos (Norley y Wardley, 1982); la reacción de la CCDA sin embargo, no parece mostrar tal especificidad (Wardley y cols., 1985).

*Linfocitos T citotóxicos y Citotoxicidad Natural.*

Se ha observado que los linfocitos citotóxicos desarrollan su actividad a partir de los 6-7 dpi, lo que jugaría un papel importante en la patogenia de la enfermedad (Norley y Wardley, 1984; Lunney, 1987; Scholl y cols., 1989). En estudios "in vitro", se ha demostrado que los linfocitos T citotóxicos, recogidos de sangre de cerdos infectados naturalmente con un aislado de baja virulencia, son capaces de lisar macrófagos porcinos infectados con virus homólogo (Martins,

1987; Martins y cols., 1988). Estos mecanismos citotóxicos parecen ser prometedores para la producción de una protección efectiva frente al virus (Alonso, 1987; Mendoza y cols., 1987; Mebus, 1988; Scholl y cols., 1989).

En varias enfermedades víricas se ha demostrado la lisis de las células infectadas por linfocitos sin una clara especificidad inmunológica siendo activadas por los interferones, el VPPA se ha observado que puede inhibir las funciones de las células NK "in vitro" (Wardley y cols., 1979; Norley y Wardley, 1983a; Mendoza y cols., 1987; Mendoza y cols., 1991; Revilla y cols., 1992).

Todos estos mecanismos parecen estar implicados en la supervivencia, y los cerdos recuperados son resistentes al enfrentamiento con virus homólogos (DeTray, 1963; Hess, 1971; Mebus, 1980; Ruiz Gonzalvo y cols., 1983; Hamdy y Dardiri, 1984; Ruiz Gonzalvo y cols., 1986b) aunque se trate de virus hemoadsorbentes y no hemoadsorbentes (Thomson y cols., 1979), pero no con virus heterólogo (Coggins y cols., 1967; Hess, 1971; DeBoer y cols., 1972; Thomson y cols., 1979; Pan y Hess, 1985; Ruiz Gonzalvo y cols., 1986b). Algunos animales recuperados muestran una resistencia parcial a la reinfección no apareciendo síntomas clínicos pero existiendo alguna replicación vírica lo que les convierte en animales portadores y eliminadores de virus que pueden afectar a poblaciones de cerdos susceptibles (DeTray, 1957; Mebus y Dardiri, 1980; Ruiz Gonzalvo y cols., 1983).

La inmunología en la enfermedad crónica ha sido estudiada en animales infectados experimentalmente que sobrevivieron después de la infección con aislados virulentos y atenuados. Estos cerdos pueden mostrar altos niveles de anticuerpos (Coggins y cols., 1967; Hess, 1971; DeBoer y cols., 1972), y también pueden producir anticuerpos neutralizantes frente a otros virus. En la PPA crónica se desarrolla una hipergammaglobulinemia (Pan y cols., 1970; DeBoer y cols., 1972; Pan y Hess, 1985) como consecuencia de una inusual cantidad de antígeno vírico en la superficie de las células infectadas, en un estado de infección persistente (Pan y cols., 1970; DeBoer y cols., 1972; Casal y cols., 1984; Arias y cols., 1986) así como por una reducción en la capacidad fagocítica de los macrófagos, lo que disminuye la retirada de los inmunocomplejos de la circulación (Mebus y Gregg, 1985; Sanchez-Vizcaíno y Ordás, 1986; Martins y cols., 1988).

En relación a la inmunidad celular, se ha descrito que la hipersensibilidad retardada contra antígenos del VPPA y los linfocitos sensibilizados específicamente pueden estar presentes durante 27 meses (Shimizu y cols., 1977; Plowright, 1980).

La enfermedad crónica es generalmente fatal y se ha sugerido que las lesiones pueden ser inmunopatológicas (Coggins y cols., 1967; Hess, 1971; Coggins, 1974; Moulton y cols., 1975; Wardley y cols., 1983; Bielefeldt y cols., 1986; Pan, 1987). En este sentido se han demostrado complejos antígeno-anticuerpo en lesiones necróticas pulmonares (Pan y cols., 1975) y en los glomérulos renales (Slauson y Sánchez-Vizcaíno, 1981; Martín-Fernández y cols., 1991) de cerdos afectados crónicamente. Igualmente y asociados a células infectadas y en necrosis se ha observado, a partir de los 11 dpi, (Fernández y cols., 1992c) la presencia de leucocitos polimorfonucleares neutrófilos, linfocitos, monocitos y macrófagos; todas estas células son capaces de mediar fenómenos de citotoxicidad (Forman y cols., 1983; Kooistra y cols., 1985; Kim, 1987; Mims, 1987; Schultz y cols., 1987).

La capacidad de los inmunocomplejos de mediar la infección en macrófagos es difícil de establecer (Peiris y cols., 1981; Sisson y Borysiewicz, 1985; Fernández y cols., 1992c) pues "in vitro", no se ha demostrado que el receptor Fc medie una infección productiva en estas células (Alcami y Viñuela, 1991), lo que permitiría una vía accesoria de infección, mecanismo empleado por otros virus causantes de enfermedades hemorrágicas (Halstead y cols., 1978).

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

### III.1. MATERIAL

#### III.1.1. Animales.

Las muestras necesarias para la realización de este trabajo se han obtenido de 12 cerdos miniatura, 7 machos y 5 hembras, de 3 meses de edad y aproximadamente 12 Kg. de peso vivo al comienzo de la experiencia, exentos de enfermedades infecciosas y parasitarias. Como tejidos control se han utilizado órganos procedentes de seis cerdos de raza Landrace seronegativos a la PPA.

Los animales fueron distribuidos en seis lotes de dos cerdos cada uno, tal como muestra el cuadro nº1, a los que se les inoculó por vía intramuscular una dosis de  $10^5 \text{HAD}_{50}$  de virus de la Peste Porcina Africana (VPPA) aislado España 75 (E75). El aislado del VPPA clasificado como hemoadsorbente, fue parcialmente atenuado tras haber recibido cuatro pases en cultivos celulares CV1 (células renales de Mono verde), tres pases en cultivos de células VERO (células renales de *Macacus rhesus*) y un pase en cultivo celular de leucocitos porcinos normales.

Los animales fueron mantenidos en boxes especiales durante toda la experiencia con la administración de alimentación y agua "ad libitum". Diariamente se controló la temperatura

---



corporal de todos los animales hasta el día del sacrificio.

El sacrificio de los animales se realizó según el cuadro n°1:

<b>LOTE</b>	<b>ANIMALES INOCULADOS</b>	<b>TIEMPO DE SACRIFICIO</b>
I	2	2 dpi
II	2	4 "
III	2	6 "
IV	2	7*-8 "
V	2	10 "
VI	2	12 "

dpi: días postinoculación; \*:uno de los animales del lote IV fue encontrado muerto a los siete días postinoculación.

La elección de estos tiempos de sacrificio fue programada en experiencias previas realizadas con el mismo aislado, así como con aislados de las mismas características de virulencia y patogenicidad, teniendo igualmente en cuenta la dosis y la vía de inoculación.

Previamente al sacrificio, los animales fueron tranquilizados con una dosis de 3.5 ml de azaperona (Stresnil<sup>®</sup>) vía intramuscular y anestesiados con 1 gr de Tiobarbital vía intravenosa.

### **III.1.2. Obtención de las muestras de órganos.**

El sacrificio se realizó en un estado de anestesia profunda del animal mediante el desangrado y la realización de la necropsia reglada de un cerdo en cada lote, tomándose inmediatamente las muestras de los distintos órganos que fueron fijadas por inmersión en formol diluido al 10% en tampón fosfato 0.1 M y en Alcohol al 96%. El tamaño de las muestras fijadas mediante inmersión en formol fue de 1 cm<sup>3</sup>, mientras que las fijadas por inmersión en alcohol tenían unas dimensiones aproximadas de (1 x 1 x 0.4) cm.

El otro animal de cada lote fue sometido a la fijación por el método de la perfusión vascular empleando glutaraldehído al 2.5% en tampón fosfato preparado según el método descrito por Sabatini y cols. (1963). La perfusión vascular se realizó siguiendo el método empleado previamente por Sierra y cols (1987); posteriormente se tomaron muestras de 1 cm<sup>3</sup> lavándose parte de ellas en tampón fosfato y se refijaron en formol tamponado.

### **III.1.3. Obtención de las muestras de sangre.**

Previo al sacrificio de cada animal se recogieron distintas cantidades de sangre que fueron depositadas en tubos conteniendo las siguientes sustancias anticoagulantes: EDTA (2.5 ml), citrato sódico (2.5 ml) y heparina (5 ml); adicionalmente, para la obtención de suero, se recogieron 10 ml de sangre que fueron depositados en tubos Venojet<sup>R</sup>.

Esta sangre fue utilizada para recuento eritrocitario, leucocitario y plaquetario. Igualmente se realizó la determinación del título de virus en sangre, así como la presencia de anticuerpos anti-virus y sus correspondientes isotipos IgM, IgA e IgG.

### III.1.4. Reactivos de Inmunohistoquímica.

#### *A. Antisueros monoclonales (MoAb).*

- 1.- MoAb (18BG3) (IgG) anti-PV 73 del VPPA (Lab. INGENASA).
- 2.- MoAb (IgG) anti-IgG1 de cerdo (Lab. SEROTEC).
- 3.- MoAb (IgG) anti-IgM de cerdo (Lab. SEROTEC).
- 4.- MoAb (IgG) anti-IgA de cerdo (Lab. SEROTEC).
- 5.- MoAb anti-queratina RCK-102 (Lab. Euro-Diagnostic.).

#### *B. Anticuerpos policlonales.*

- 6.- Anticuerpo anti-antígeno relacionado con el factor VIII de la coagulación (Lab. Dakopatts).

#### *C. Antisueros conjugados.*

- 7.- Suero anti-IgG de conejo creado en cerdo y conjugado con biotina (Vectastain ABC Kit, Lab. Vector).
- 8.- Suero anti-Ig G de ratón creado en cabra y conjugado con biotina (Lab. Dakopatts).
- 9.- Complejo Avidina-biotina-peroxidasa (Vectastain ABC Kit, Lab. Vector).
- 10.- Complejo Streptavidina conjugada con Fosfatasa Alcalina (Lab. BioGenex).

#### *D. Sueros no inmunes.*

- 11.- Suero normal de cabra (Lab. Vector).
- 12.- Suero normal de cerdo (Lab. Vector).

#### *E. Cromógenos.*

- 13.- Diaminobenzidina (3,3', diaminobenzidine tetrahydrochloride) (Lab. Sigma).
- 14.- Sustrato Fast Red (Lab. BioGenex).

#### *F. Tampones.*

- 15.- PBS. Fosfato Buffer Salino pH 7.2.
- 16.- TBS. Tris Buffer Salino (Lab. Sigma) pH 7.6.

## III.2. MÉTODOS

### III.2.1. Estudio Estructural.

Las muestras fijadas en glutaraldehído se lavaron en tampón fosfato (pH 7.2) y se refijaron en formaldehído tamponado al 10%. Las muestras fijadas en alcohol al 96% se procesaron según el método descrito por Sainte-Marie (1962) incluyéndose los tejidos en ambos casos en parafina para lo que se utilizó un procesador de tejidos Shandon 2L processor MK11 con bomba de vacío incorporada.

Para el estudio histológico se realizaron cortes de 3 a 4 micrómetros de grosor que fueron teñidos con la técnica de hematoxilina-eosina, Giemsa, PAS, Frasser-Lemdrum y PTAH.

Los cortes fueron realizados con un microtomo Reicher Jung 1130/Biocut 20. Para el estudio estructural e inmunocitoquímico dichos cortes histológicos fueron observados y fotografiados con los microscopios Zeiss modelo Axiophot y Olympus Vanox-T modelo AH-2.

### III.2.2. Estudio Inmunohistoquímico.

Para la realización del estudio inmunohistoquímico, parte de las muestras refijadas en formol se lavaron durante 12 horas a 4° C en TBS y, junto con las muestras fijadas primariamente en formol y alcohol, se incluyeron en parafina según el método rutinario y el descrito por Sainte-Marie (1962) respectivamente. De estas muestras se realizaron cortes de 3 micrómetros de grosor sobre los que se utilizaron varias técnicas inmunocitoquímicas.

### **III.2.2.1. Pretratamientos.**

Como pasos previos a las determinaciones inmunohistológicas se realizaron, según el caso, los siguientes pretratamientos:

#### **\* Digestión enzimática.**

Las digestiones enzimáticas de los cortes histológicos desparafinados fueron realizados con la finalidad de desenmascarar antígenos víricos, para lo cual se empleó tripsina y/o pronasa. La tripsinización se realizó antes de la incubación de los cortes con suero normal; para ello, los cortes desparafinados se sometieron al tratamiento con una solución acuosa de tripsina (Lab. Fluka) al 0.25% y  $Cl_2Ca$  al 0.02%, manteniendo el pH a 7.6. Este tratamiento se realizó durante 60 minutos a 37° C.

La pronasa (Proteasa E, Sigma Chemical Co.) fue utilizada al 0.1% en PBS, incubando los cortes durante 10 minutos a temperatura ambiente. Este tratamiento resultó más adecuado que la tripsinización en la detección de la proteína vírica PV73 del VPPA y de las inmunoglobulinas porcinas en los tejidos fijados en formol tamponado al 10%.

#### **\* Procedimiento de elución de anticuerpos.**

Con la finalidad de eliminar posibles enmascaramientos y bloqueos de antígenos del VPPA por parte de los anticuerpos desarrollados en la respuesta inmune, se empleó la técnica descrita por Porter y cols. (1973), quienes la utilizaron con resultados positivos en la enfermedad Aleutiana del Visón. Para ello, antes de la digestión enzimática con pronasa, los cortes fueron sumergidos durante 3 horas a 37°C en un tampón citratado 0.01 M con Albúmina Bovina (Sigma Chemical Co.) al 0.02%, manteniendo el pH a 3.2.

### **III.2.2.2. Demostración de la proteína viral PV73.**

Con esta finalidad se emplearon dos técnicas inmunohistológicas: la Avidina-Biotina-Peroxidasa (ABC) y la Streptavidina conjugada con fosfatasa alcalina (Strp FA) utilizando como reactivo primario un anticuerpo monoclonal dirigido contra la proteína vírica PV73.

El procedimiento técnico abarcó los siguientes pasos:

- 1- Desparafinado: mediante tres pases por xilol de 10 minutos cada uno.
- 2- Rehidratación: utilizando pases de 5 minutos en una escala descendente de alcoholes (100, 96 y 70%).
- 3- Inhibición de la peroxidasa endógena sometiendo los cortes a la acción del alcohol metílico con  $H_2O_2$  al 2.5% durante 30 min.
- 4- Dos lavados en  $H_2O$  destilada de 5 min. cada uno.
- 5- Un lavado en PBS durante 5 min.
- 6- Digestión enzimática con Pronasa al 0.1% en PBS durante 10 min. a temperatura ambiente.
- 7- Tres lavados de 10 min. en PBS.
- 8- Incubación en cámara húmeda con suero normal de cabra diluido al 1/100 en PBS durante 30 min. a temperatura ambiente.
- 9- Retirada del exceso de suero normal e incubación con el anticuerpo monoclonal anti-PV73 (18BG3) diluido al 1/10 en PBS durante 18 horas a 4° C.
- 10- Tres lavados de 10 min. en PBS.
- 11- Incubación con suero anti-IgG de ratón creado en cabra y conjugado con biotina diluido al 1/20 en PBS durante 30 min. a temperatura ambiente.
- 12- Dos lavados de 10 min. en PBS.

En este punto los procedimientos variaron según la técnica inmunohistológica empleada:

#### **ABC.**

- 13.- Incubación de los cortes con un complejo Avidina-biotina-peroxidasa (ABC) en cámara húmeda, durante 1 hora a temperatura ambiente.
- 14.- Dos lavados de 10 min. en PBS.

- 15.- Un lavado de 10 min. en TBS.
- 16.- La reacción fue revelada durante 1 minuto con Diaminobencidina (DAB) diluida al 0.03% en TBS y en presencia de peróxido de hidrógeno ( $H_2 O_2$ ).
- 17.- Lavado de 10 min. en agua corriente.
- 18.- Contratación nuclear con hematoxilina durante 1 minuto, deshidratación y montaje según el procedimiento habitual.

### **Strp FA.**

- 13.- Incubación de los cortes durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda con el reactivo Streptavidina conjugado con fosfatasa alcalina a una dilución de 1/25 en PBS.
- 14.- Dos lavados de 10 min. en PBS.
- 15.- Un lavado de 10 min. en TBS.
- 16.- Revelado de la reacción mediante la utilización del cromógeno Fast Red al 0.02% en Tris buffer conteniendo naphthol durante 5-10 min.
- 17.- Lavado en agua corriente durante 10 min.
- 18.- Contratación nuclear con hematoxilina durante 1 minuto.
- 19.- Lavado en agua corriente durante 5 min.
- 20.- Montaje en medio acuoso immu-mount<sup>R</sup> (Shandon Co.)

Para la puesta a punto de la técnica inmunohistológica idónea utilizamos cortes de bazo de los animales sacrificados a los 4 dpi. Los resultados obtenidos con los distintos fijadores utilizados los resumimos en la tabla nº 2:

	FIJADOR		
	FORMOL	ALCOHOL	GLUTARALDEH.
<i>Tinción específica</i>	+++	++	+
<i>Tinción inespecífica</i>	-	+	+

(-): negativo; (+): positividad moderada; (++): positividad intensa; (+++): positividad muy intensa.

La inmunorreacción positiva específica se presentó distribuida homogéneamente por el citoplasma apareciendo, en algunas ocasiones, en forma de inclusiones redondeadas circunscritas de coloración más intensa localizadas en posición yuxtannuclear.

El número de células y la intensidad de la reacción positiva específica observada con el MoAb anti-PV73 y con los MoAbs anti-IgM, IgG e IgA porcinas fueron máximas al utilizar cortes de tejidos fijados con formol tamponado siendo en estos casos, inapreciable la tinción inespecífica de fondo. En tejidos fijados con alcohol al 96% la inmunorreacción específica fue sensiblemente menor apareciendo una marcada reacción inespecífica en el plasma y en el tejido conectivo. Finalmente, el glutaraldehido fue el fijador con el que obtuvimos peores resultados al detectar una escasa cantidad de antígeno, mientras que permanecía una intensa tinción inespecífica de fondo.

### ***III.2.2.3. Demostración de inmunoglobulinas IgM, IgG e IgA porcinas.***

La detección de inmunoglobulinas porcinas fue realizada en tejidos fijados en formol e incluidos en parafina utilizando la técnica de la Avidina-Biotina-Peroxidasa (ABC) descrita por Hsu y cols (1981).

Previamente a la incubación con los anticuerpos primarios, los cortes fueron sometidos a digestión enzimática con Pronasa según hemos indicado anteriormente. A continuación se procedió a la incubación con los anticuerpos monoclonales anti-IgM de cerdo a una dilución 1/20;



anti-IgG diluido a 1/50 y anti-IgA a una dilución 1/150, durante 18 horas a 4° C.

Como suero secundario se utilizó un suero anti-IgG de ratón conjugado con biotina durante 30 min. a temperatura ambiente en una dilución 1/20 en PBS y, como reactivo terciario, se utilizó el complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa (ABC) durante 1 hora a temperatura ambiente.

#### ***III.2.2.4. Demostración de queratinas en el epitelio de las tonsilas.***

Con el objetivo de determinar las células epiteliales tonsilares y la posible presencia de la PV73 en estas células, se realizaron las dos técnicas siguientes:

- La primera, empleando dos cortes seriados en los que se utilizó el anticuerpo anti-PV73 y anti-filamento intermedio RCK-102 respectivamente.
- Y, una segunda, mediante la técnica de doble marcaje combinando el ABC y la Strp FA, realizando en primer lugar la determinación y revelado con DAB de la proteína RCK-102, e incubando a continuación con el anticuerpo anti-PV73 y revelando la fosfatasa alcalina con el sustrato Fast-red.

#### ***III.2.2.5. Determinación del antígeno relacionado con el Factor VIII de la coagulación.***

Con el objetivo de determinar la participación de las plaquetas en los procesos de microtrombosis observadas en los distintos órganos, fue determinada la presencia de antígeno relacionado con el F-VIII en la composición de los microtrombos localizados en el riñón y en el pulmón.

Los cortes desparafinados fueron sometidos a un pretratamiento con pronasa, según el método descrito previamente, e incubados con suero normal de cerdo diluido al 1/100 en PBS durante 30 min. a temperatura ambiente. Como anticuerpo primario se utilizó un suero desarrollado en conejo anti Factor VIII a una dilución 1/800 en PBS durante 18 h a 4°C. Como anticuerpo puente se empleó un anticuerpo anti-IgG de conejo biotinado a una dilución 1/200 en PBS y como reactivo terciario, se añadió el complejo ABC.

### **III.2.3. Estudio Hematológico.**

#### **III.2.3.1. Recuento de hematíes y leucocitos.**

Éstos se realizaron empleando la sangre heparinizada diluyendo parte de la misma al 1/100.000 para el conteo de hematíes y a una dilución 1/1000 para el recuento de leucocitos. Para la dilución se utilizó el líquido ISOTRON II realizándose el recuento con un contador automático de células Coulter Counter Sampling Stand II, modelo C-256 y un Coulter Counter modelo ZM.

#### **III.2.3.2. Recuento de plaquetas.**

Para el recuento de plaquetas, la sangre con EDTA fue diluida al 1/100 en líquido para conteo plaquetario (PLAQUET-CROM<sup>®</sup>) y se empleó la cámara de Neubauer y un microscopio Leitz modelo Laborolux 11 para su observación y recuento.

#### **III.2.3.3. Estudio virológico y serológico.**

Para la obtención del suero, la sangre fue precentrifugada a 1.500 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se volvió a centrifugar 9.000 rpm durante 30 minutos utilizándose en ambos casos, una centrífuga refrigerada IEC (International Equipment Company USA) CENTRA-7R; el suero fue recogido y se congeló a -70°C hasta su utilización.

El título de virus en sangre completa fue realizado gentilmente por el Dr. Gonzalvo y la determinación de los isotipos de inmunoglobulinas porcinas anti-VPPA en el suero fue realizada mediante el método de ELISA por el Dr. Domínguez, ambos investigadores del Centro de Investigación en Sanidad Animal de Valdeolmos (INIA, Madrid).

*Esta experiencia ha sido realizada en colaboración con el Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA) de Madrid, el cual nos facilitó los animales, el aislado de VPPA, los equipos para el estudio hematológico y los locales donde se llevó a cabo la inoculación y la recogida de muestras.*

## IV. RESULTADOS

## IV.1. ESTUDIO ESTRUCTURAL.

### IV.1.1. OBSERVACIONES EN TONSILAS.

#### LOTE I (2 dpi).

Las criptas tonsilares mostraron una ligera descamación con infiltración intraepitelial de células mononucleares y algunos granulocitos neutrófilos.

En el tejido interfolicular se evidenciaron algunos histiocitos, linfocitos, neutrófilos y eosinófilos de morfología normal; los folículos linfoides presentaron características histológicamente normales, destacando algunas figuras de mitosis.

#### LOTE II (4 dpi).

Las luces de las criptas contenían células descamadas entremezcladas con algunos leucocitos y linfocitos, los cuales también aparecían en las zonas epitelial y subepitelial.

En las áreas interfoliculares se apreció un ligero aumento de células mononucleares, alguna de las cuales y desde este día de sacrificio, mostraban hiper cromatismo cortical. Por otra parte, los folículos linfoides manifestaron un aumento del número de células en mitosis.

**LOTE III (6 dpi).**

En estos animales aumentó considerablemente la descamación celular en las criptas en donde se entremezclaban preferentemente células epiteliales, mononucleares y polimorfonucleares. Igualmente, la infiltración intraepitelial de leucocitos aumentó observándose marginación periférica de la cromatina en las células mononucleares.

Los vasos del tejido interfolicular presentaron abundantes células mononucleares circulantes, destacando los monocitos. En el estroma destacó la infiltración de linfocitos, macrófagos y células plasmáticas. Leucocitos eosinófilos y, en menor número, los neutrófilos también estaban presentes en las áreas interfoliculares. Los folículos linfoides presentaron abundantes células en mitosis y algunas células mononucleares en degeneración y necrosis.

**LOTE IV (7 dpi\* - 8 dpi).**

El epitelio estratificado de las criptas tonsilares mostró una mayor infiltración celular caracterizada por numerosas células mononucleares. En la luz de las criptas aparecían abundantes células descamadas y restos celulares. El tejido interfolicular y los folículos linfoides también presentaron cambios más manifiestos que los descritos en el lote anterior.

El animal muerto mostró los cambios degenerativo-necróticos más graves a este nivel; con focos de necrosis que abarcaban amplias zonas de las criptas, con desprendimiento del epitelio, abundantes células inflamatorias y presencia de colonias bacterianas. Los tejidos subepitelial e interfolicular mostraron una intensa hiperemia e infiltración de células mononucleares y polimorfonucleares entre los que resaltan los neutrófilos y los eosinófilos.

Los folículos linfoides de las tonsilas manifestaron una intensa depleción, con escasas mitosis y abundantes células en degeneración y necrosis.

**LOTE V (10 dpi).**

Las criptas y zonas interfoliculares presentaron lesiones similares a los lotes anteriores, con dilatación y restos celulares desprendidos en las primeras y, numerosos leucocitos infiltrados en las segundas.

Los folículos linfoides mostraron una acentuada depleción, con escasas mitosis y numerosas células mononucleares en degeneración y necrosis.

**LOTE VI (12 dpi).**

Las lesiones coincidieron con las observadas en el lote anterior, destacando los fenómenos inflamatorios en el tejido interfolicular, caracterizado por una marcada hiperemia y numerosos histiocitos, neutrófilos y eosinófilos.

Los folículos linfoides también presentaron una intensa depleción con numerosas células mononucleares en necrosis. Los macrófagos intraepiteliales, interfoliculares y foliculares presentaban con frecuencia en su citoplasma eritrocitos y restos celulares.

**IV.1.2. OBSERVACIONES EN GANGLIOS LINFÁTICOS.****LOTE I (2 dpi).**

Ninguno de los ganglios linfáticos estudiados (mandibulares, mediastínicos, gastrohepáticos, renales y poplíteos) mostró cambios histológicos significativos con respecto a los animales control. Únicamente cabe destacar un ligero aumento en el número de mitosis en los centros germinales de los folículos linfoides así, como un mayor número de células en los senos linfáticos capsulares y en la luz de las vénulas postcapilares.

**LOTE II (4 dpi).**

El tejido linfoide difuso y los centros germinales de todos los ganglios analizados presentaron numerosas figuras de mitosis. También se observó un aumento de los distintos tipos celulares alrededor de las vénulas postcapilares; los macrófagos libres y fijos presentes en los senos y tejido linfoide difuso mostrando frecuentes fenómenos de hiperchromatosis cortical. Otros elementos celulares presentes en estos ganglios fueron los eosinófilos y, en menor grado, neutrófilos.

El ganglio gastrohepático presentó, a nivel de tejido linfoide difuso, la mayor cantidad de macrófagos con procesos de degeneración y necrosis, conteniendo estas células en muchos casos, abundantes vacuolas fagocitarias. A nivel subcapsular también se observó un aumento del número de eritrocitos, muchos de ellos fagocitados por macrófagos libres o fijos, los cuales presentaban fenómenos de hemoadsorción asociados a hiperchromatosis cortical.

**LOTE III (6 dpi).**

En los senos subcapsulares y, en menor medida, en los trabeculares aumentó considerablemente el número de eritrocitos, muchos de ellos fagocitados por macrófagos con signos de degeneración y necrosis. Algunos linfocitos, entremezclados con eritrocitos, próximos a las zonas subcapsulares también presentaron degeneración y necrosis.

En el tejido linfoide difuso se presentaron abundantes macrófagos en degeneración y necrosis reconocidos por los cambios nucleares de hipercromatosis cortical, picnosis, cariorrexis y cariólisis. Otros elementos celulares presentes fueron eosinófilos y neutrófilos, con frecuencia próximos a las áreas de necrosis. Los folículos linfoides presentaban una moderada depleción, escasas mitosis así como algunos macrófagos y linfocitos en degeneración y necrosis.

Los fenómenos vasculares degenerativo-necróticos y hemorrágicos fueron más intensos en el ganglio gastrohepático y el renal, afectando secuencialmente en intensidad a las zonas de los senos subcapsulares, trabeculares, áreas del tejido linfoide difuso y folículos linfoides.

**LOTE IV (7 dpi\* - 8 dpi).**

Los ganglios del animal sacrificado a los 8 dpi manifestaron una mayor intensidad en las lesiones congestivo-hemorrágicas afectando a los senos y a gran parte del tejido linfoide difuso. En estas zonas se observaron abundantes macrófagos libres y fijos con fenómenos de hipercromatosis cortical y eritrofagocitosis, mientras otros mostraron picnosis, cariorrexis y cariólisis. El tejido linfoide difuso presentaba una intensa hiper celularidad con la presencia de abundantes histiocitos y linfocitos, muchos de ellos, en degeneración y necrosis.

Los procesos degenerativo-necróticos y hemorrágicos fueron intensos en el ganglio gastrohepático y el renal en los que, prácticamente sólo se evidenciaron los folículos linfoides mientras en el tejido linfoide difuso y los senos mostraban una gran cantidad de eritrocitos, restos celulares y macrófagos aislados. Otros leucocitos, como neutrófilos y eosinófilos, se presentaban alrededor de zonas de hemorragia y próximos a focos de necrosis. Los vasos sanguíneos en general y las vénulas postcapilares mostraron una ligera tumefacción endotelial e hialinización de moderada a intensa en sus paredes. Los centros germinales de los folículos presentaron escasas mitosis así como algunos macrófagos y linfocitos en degeneración y necrosis.

En el animal muerto y a diferencia de los animales sacrificados, el ganglio mandibular y el mediastínico también evidenciaron marcados procesos necrótico-hemorrágicos con abundantes restos celulares tanto libres como en el interior de macrófagos y neutrófilos. Los folículos linfoides de estos ganglios presentaban una intensa depleción conteniendo entre los restos celulares algunas células mononucleares con hiperchromatosis cortical.

Los ganglios renales y gastrohepáticos presentaban una pérdida total de la arquitectura tisular normal estando ocupado el parénquima ganglionar prácticamente por un coágulo de sangre, sólo se evidenciaron algunas células mononucleares, restos de folículos linfoides y vasos sanguíneos trombosados y/o mostrando una intensa tumefacción endotelial e hialinización de sus paredes.

#### **LOTE V (10 dpi).**

Los senos linfáticos y el tejido linfoide difuso presentaron cambios histológicos similares a los descritos en el lote anterior (8 dpi). Los centros germinales foliculares mostraron algunas figuras de mitosis y especialmente, fue significativo en estos animales, la delimitación con el área folicular periférica en donde aparecían abundantes linfocitos maduros. En algunos folículos pocas células mononucleares mostraban marginación periférica de la cromatina así como algunas necrosis apoptóticas.

El ganglio mediastínico presentó abundantes restos celulares en los senos y en el tejido linfoide difuso, en donde aparecían también hemorragias muy manifiestas.

En el ganglio renal y en el gastrohepático los cambios vasculares fueron muy intensos con abundantes elementos sanguíneos en los senos dilatados y, en gran parte del tejido linfoide difuso. Alrededor de estas hemorragias y en las zonas profundas del parénquima aparecieron numerosos eosinófilos.

#### **LOTE VI (12 dpi).**

En los senos linfáticos y en menor medida, en el tejido linfoide difuso se observaron abundantes hematíes además, muchos macrófagos fijos y libres de estas áreas mostraron hiperchromatosis cortical así como vacuolas fagocíticas con eritrocitos y restos celulares. Los



folículos linfoides presentaron abundantes células mononucleares en las áreas periféricas con degeneración y necrosis, apareciendo numerosos restos celulares y eritrocitos fagocitados por macrófagos y granulocitos. Los vasos ganglionares y, particularmente las vénulas postcapilares mostraron lesiones más manifiestas que en el lote anterior observándose las células endoteliales tumefactas, con vacuolización nuclear e hialinización de la pared vascular.

El ganglio gastrohepático y el renal y, en menor medida el mediastínico, presentaron las lesiones más graves, consistentes en amplias áreas necróticas y hemorrágicas que afectaban prácticamente a la totalidad del órgano.

#### **IV.1.3 OBSERVACIONES EN BAZO.**

##### **LOTE I (2 dpi).**

En la pulpa esplénica roja se observó una congestión moderada principalmente en las zonas marginales y vainas macrofágicas donde también se observaron frecuentes figuras de mitosis.

Tanto las vainas linfoides periarteriales (VLP) como los centros germinales presentaban características histológicas normales, éstos últimos mostraron frecuentes figuras de mitosis.

##### **LOTE II (4 dpi).**

La pulpa esplénica roja mostró una congestión más manifiesta. Distribuidos difusamente se observaron numerosos macrófagos y linfocitos con hipercromatosis cortical o en necrosis, los restos celulares aparecían libres o bien fagocitados por macrófagos y neutrófilos, estos cambios fueron particularmente marcados en las zonas marginales o perifoliculares.

Las vainas macrofágicas presentaban congestión y procesos de degeneración y necrosis de los macrófagos y/o células reticulares que constituyen esta estructura.

En estos animales se observaron numerosos macrófagos fijos y libres con hipercromatosis cortical que mostraban simultáneamente imágenes de hemoadsorción localizadas preferentemente en las zonas marginales, vainas macrofágicas y senos de la pulpa esplénica roja.

En las zonas más periféricas de las VLP y en los centros germinales se observaron algunos macrófagos y linfocitos en degeneración y necrosis. Estas zonas se encontraron infiltradas por eritrocitos y neutrófilos, observándose eritrocitos y restos celulares fagocitados en el citoplasma de macrófagos. La necrosis se observó de forma difusa a algunos folículos linfoides, disminuyendo el número de mitosis comparativamente con las observadas en el lote anterior.

### **LOTE III (6 dpi).**

En la pulpa esplénica roja predominaron los eritrocitos y los restos celulares junto a macrófagos en degeneración fagocitando eritrocitos y/o restos celulares. Asociados a estas zonas de necrosis se observaron con frecuencia neutrófilos y eosinófilos.

Las vainas macrofágicas se observaron desestructuradas con intensa congestión, abundantes eritrocitos extravasados y necrosis más intensa que en los lotes anteriores.

La pulpa esplénica blanca se encontraba muy deplecionada; con abundantes células mononucleares y linfocitos en degeneración y necrosis, y con aumento del número de eritrocitos y neutrófilos en estas áreas más lesionadas.

### **LOTE IV (7 dpi\* - 8 dpi).**

En el animal sacrificado (8 dpi), los cambios observados en la pulpa esplénica blanca y zonas marginales fueron similares a los del lote anterior, si bien, fueron más intensas las necrosis de células mononucleares. En las zonas marginales fueron también observados neutrófilos, eosinófilos, mielocitos y algunos megacariocitos.

Las vainas macrofágicas estaban hialinizadas y desestructuradas presentando una marcada degeneración y necrosis de las células macrofágicas y linfocitos de esta zona.

En el animal muerto (7 dpi), la pulpa esplénica roja mostró una intensa congestión con acumulación de sangre en áreas en las que se ha perdido la arquitectura del órgano, observándose únicamente restos de folículos linfoides y algunos macrófagos, neutrófilos y eosinófilos.

Las vainas macrofágicas estaban hialinizadas permaneciendo visibles, en algunas, las luces capilares. En los vasos sanguíneos y en los senos venosos se observaron lesiones congestivo-hemorrágicas caracterizadas por microtrombosis, hialinización de la pared vascular y mallas de fibrina extravasada.

**LOTE V (10 dpi).**

Los cambios observados fueron similares a los descritos en el cerdo sacrificado a los 8 dpi. Los vasos sanguíneos presentaron lesiones más intensas siendo igualmente, más manifiestos los procesos degenerativo-necróticos de células mononucleares, tanto en la pulpa esplénica roja como en la pulpa esplénica blanca. Es de destacar la presencia en estos animales de una moderada proliferación linfoplasmocitaria de carácter difuso.

**LOTE VI (12 dpi).**

Además de los procesos observados en el lote anterior, en los vasos trabeculares se observaron abundantes monocitos y linfocitos circulantes en necrosis.

La pulpa esplénica roja estaba intensamente hiperémica, con pérdida de la arquitectura en algunas zonas, caracterizada por hialinización de los cordones esplénicos, numerosas células macrofágicas en degeneración y necrosis y abundantes restos celulares asociados a fibrina. Otros elementos celulares observados fueron mielocitos, células plasmáticas y megacariocitos con distribución difusa. La pulpa esplénica blanca manifestó lesiones idénticas a las observadas en los animales sacrificados a los 10 dpi.

**IV.1.4. OBSERVACIONES EN MÉDULA ÓSEA.****LOTE I (2 dpi).**

La médula ósea mantenía una estructura normal observándose numerosos focos de células hematopoyéticas, en éstos se observaron frecuentes figuras de mitosis, células sanguíneas inmaduras y megacariocitos. Los senos vasculares mostraron una moderada congestión sin otros cambios significativos.

**LOTE II (4 dpi).**

Los senos vasculares se observaron dilatados conteniendo abundantes eritrocitos y leucocitos maduros circulantes. Numerosas células mononucleares circulantes o fijas (células reticulares) presentaban marginación de la cromatina y en escaso número, fenómenos de picnosis y cariorrexis. Alguna de estas células contenían restos necróticos y eritrocitos fagocitados siendo

---

frecuentes las células en mitosis en las áreas hematopoyéticas.

### **LOTE III (6 dpi).**

Junto a los cambios descritos en el lote anterior, apareció un mayor número de células mononucleares en necrosis tanto en las áreas hematopoyéticas como sinusoidales.

Los megacariocitos disminuyeron en número manifestando cambios morfológicos, especialmente a nivel nuclear, con marginación periférica de la cromatina o picnosis.

### **LOTE IV (7 dpi\* - 8 dpi).**

El animal sacrificado presentó intensos fenómenos citopáticos en las distintas áreas de la médula ósea, representados por numerosas células mononucleares con hipercromatosis cortical, eritrofagocitosis o con picnosis. El número de eritrocitos aumentó considerablemente en la médula especialmente, en las zonas en las que la necrosis fue más manifiesta. Los megacariocitos, más escasos que en lotes anteriores, presentaban signos de degeneración y necrosis.

En el animal encontrado muerto (7 dpi) la presencia de células sanguíneas circulantes fue más intensa y las células mononucleares macrofágicas y los linfocitos presentaban signos degenerativo-necróticos muy intensos asociados a la presencia de fibrina.

En este animal el número de megacariocitos fue muy escaso presentándose igualmente leucocitos granulocíticos inmaduros con marcados signos de degeneración y necrosis.

### **LOTE V (10 dpi).**

Los vasos y sinusoides contenían gran cantidad de eritrocitos, desplazando éstos las áreas hematopoyéticas que se reconocían en nidos donde aparecían algunas en mitosis y signos de degeneración y necrosis celular. Al igual que en los lotes anteriores, muchos monocito/macrófagos, libres y fijados, presentaban hipercromatosis cortical y vacuolas fagocíticas; otros también picnosis, cariorexis y cariólisis.

Los megacariocitos eran muy escasos presentando signos de degeneración y necrosis. En estos animales se observaron numerosos mielocitos en necrosis así como neutrófilos y eosinófilos normales.

**LOTE VI (12 dpi).**

En estos animales las lesiones observadas fueron ligeramente menores que en los del lote anterior, pero se mantuvieron las necrosis de las células localizadas preferentemente en las áreas correspondientes a los senos. En cambio los megacariocitos se observaron en mayor número que en los lotes anteriores, presentándose algunos de ellos en división y otros con marginación periférica de la cromatina.

**IV.1.5. OBSERVACIONES EN HÍGADO.****LOTE I (2 dpi).**

Los lobulillos hepáticos de estos animales no mostraron cambios histológicos significativos que pudieran diferenciarlos de las observaciones realizadas en los animales control. Las células de Kupffer no presentaron cambios histológicos apreciables en los sinusoides, destacando por el contrario numerosos leucocitos circulantes.

**LOTE II (4 dpi).**

Este órgano presentó una hiperemia moderada y un ligero edema intersticial en el espacio porta y septos interlobulillares. En ambas zonas se detectaron histiocito/ macrófagos con marginación de la cromatina y, en un menor número, picnosis y cariorrexis. En estas áreas también se observó un ligero aumento de linfocitos y granulocitos.

En los sinusoides se apreció una ligera dilatación con numerosos monocitos y linfocitos circulantes, alguno de los cuales mostraba marginación de la cromatina y, menos frecuentemente, picnosis. Otras células sanguíneas frecuentes en los sinusoides fueron los granulocitos neutrófilos y los eosinófilos.

Las células de Kupffer, en un mayor número que en el lote I, se presentaron hipertróficas e hiperplásicas, fenómenos que fueron más manifiestos en las zonas perilobulillares. Estas células aparecieron, en muchos casos, con marginación de la cromatina y eritrofagocitosis.

A partir de los 4 dpi, numerosos monocitos circulantes y células de Kupffer hipertróficas mostraron una corona de eritrocitos adheridos a su superficie, imagen que caracteriza al fenómeno

de hemoadsorción, la cual fue más evidente en los animales perfundidos con glutaraldehído.

### **LOTE III (6 dpi).**

Las lesiones fueron similares a las descritas en el lote anterior, destacando un mayor grado de hiperemia e infiltración celular en el intersticio hepático, tanto en el espacio periportal como interlobulillar. En los sinusoides, las células de Kupffer presentaron mayoritariamente cambios degenerativos, eritrofagocitosis y fenómenos de hemadsorción. En estas zonas aumentaron los restos necróticos circulantes asociados a leucocitos.

### **LOTE IV (7 dpi\* - 8 dpi).**

El tejido intersticial mostró una mayor edematización y aumento del infiltrado mononuclear caracterizado por histiocito/ macrófagos, linfocitos, células plasmáticas, neutrófilos y eosinófilos, algunos de los cuales presentaban signos degenerativos.

En los sinusoides los cambios más significativos correspondieron a un aumento de las células en necrosis, así como la edematización del espacio de Disse. En estas zonas las células de Kupffer mostraron hipertrofia e hiperplasia, presentando mayoritariamente signos de hiper cromatosis cortical, picnosis, cariorrexis y cariólisis. En este animal se observaron hepatocitos con hiper cromatosis cortical y tumefacción citoplasmática en las regiones peri y mediolobulillares.

En el animal muerto (7 dpi), los cambios descritos fueron más acentuados destacando, como características diferenciales, una hiperemia intensa, un aumento considerable del infiltrado inflamatorio en el tejido intersticial en el que abundaban los eosinófilos, neutrófilos y restos celulares.

Los sinusoides presentaron abundantes células mononucleares circulantes en necrosis y granulocitos inmaduros próximos a restos celulares. Todo ello, entre una gran cantidad de eritrocitos que en algunas zonas se presentaban extravasados. Las lesiones degenerativo-necróticas de las células de Kupffer se intensificaron en este animal afectando a todo el lobulillo. Igualmente, y de forma difusa, en las distintas áreas lobulillares se presentaron numerosos hepatocitos con marginación de la cromatina o con signos de picnosis y cariorrexis; estas células aparecían

aisladas o bien en grupos, alrededor de los cuales existían abundantes eritrocitos y granulocitos.

#### **LOTE V (10 dpi).**

En este lote, los cambios histológicos fueron similares a los presentes en el animal sacrificado a los 8 dpi con una evidente dilatación de los vasos y sinusoides, con presencia de abundantes células en circulación así como en el tejido intersticial hepático. Los monocito/macrófagos circulantes y las células de Kupffer mostraron con frecuencia, cambios degenerativos e imágenes de hemoadsorción y eritrofagocitosis.

Los hepatocitos, de forma aislada o en pequeños grupos, evidenciaron procesos degenerativos con tumefacción nuclear y citoplasmática así como degeneración microvacuolar en algunos lobulillos.

#### **LOTE VI (12 dpi).**

El tejido intersticial hepático presentó mayor edematización y proliferación celular intersticial constituida por macrófagos y células linfoplasmocitarias.

Los sinusoides estaban marcadamente dilatados conteniendo abundantes eritrocitos, monocito/macrófagos circulantes, linfocitos, granulocitos y restos celulares. Las células de Kupffer fueron más numerosas en estos cerdos manteniéndose los cambios degenerativo-necróticos y los fenómenos de hemoadsorción indicados anteriormente.

Numerosos hepatocitos presentaban marginación de la cromatina y necrosis aisladas o en grupos configurándose, en estos casos, pequeñas lagunas hemáticas constituidas por abundantes eritrocitos, restos de hepatocitos y algunos granulocitos.

#### **IV.1.6 OBSERVACIONES EN PULMÓN.**

##### **LOTE I (2 dpi).**

Este órgano presentó una moderada hiperemia con ligera dilatación de los capilares interalveolares. En estos vasos se observaron fundamentalmente células mononucleares y algunos linfocitos circulantes. Otros elementos celulares presentes en las luces vasculares fueron neutrófilos y eosinófilos. Las luces bronquiales y bronco-alveolares no presentaron cambios histológicos significativos.

##### **LOTE II (4 dpi).**

En los septos interalveolares los capilares septales contenían numerosas células, en su mayoría mononucleares. El núcleo de muchas de estas células presentaba marginación periférica de la cromatina y en menor medida picnosis. Se podían diferenciar por sus características morfológicas células mononucleares de mayor volumen ocupando la luz vascular, algunas con signos degenerativos; estas células probablemente corresponden a macrófagos intravasculares pulmonares (MIPs).

Otros elementos celulares presentes en cantidades considerables fueron los linfocitos, neutrófilos, eosinófilos, mielocitos y algún megacariocito circulante.

##### **LOTE III (6 dpi).**

Las modificaciones más manifiestas se localizaron igualmente en los septos con una clara hiper celularidad caracterizada por numerosos monocito/ macrófagos con hiper cromatosis cortical, picnosis, cariorrexis y cariolisis; algunos de ellos contenían en su citoplasma restos celulares.

Otras células circulantes que se presentaron de forma constante fueron los neutrófilos, eosinófilos, linfocitos y algunos megacariocitos. Es de destacar la presencia de abundantes células en mitosis a nivel de los septos interalveolares.

##### **LOTE IV (7 dpi\* - 8 dpi).**

Los capilares interalveolares presentaron una mayor dilatación con presencia de abundantes eritrocitos y leucocitos. Los monocito/ macrófagos circulantes y los adheridos al endotelio



vascular mostraron signos de degeneración, coincidiendo con la aparición de abundantes restos celulares en las luces capilares.

El animal muerto presentó una intensa hiperemia con dilatación de grandes vasos y septos interalveolares; en estos vasos aparecieron abundantes trombos, lesiones en el endotelio y pared vascular, así como una marcada edematización el tejido intersticial perivascular de todo el parénquima pulmonar. Igualmente fueron observadas algunas zonas de hemorragia intersticial y alveolar asociadas a restos celulares. No fueron observados macrófagos alveolares lesionados, pero si fueron numerosos los mismos tipos celulares descritos en el lote anterior, destacando la presencia de algún megacariocito.

#### **LOTE V (10 dpi).**

Las lesiones fueron similares a las descritas en el animal sacrificado a los 8 dpi. En lo referente a los septos interalveolares, destacaba la presencia de un gran número de linfocitos circulantes y numerosas mitosis junto a monocito/ macrófagos, eosinófilos y neutrófilos circulantes. En la luz de bronquios y alvéolos sólo se observó la presencia de algunas células epiteliales descamadas.

#### **LOTE VI (12 dpi).**

Los cambios vasculares observados en estos cerdos fueron intensos con engrosamiento de los septos interalveolares y colapsamiento alveolar focal. En vasos sanguíneos de distinto calibre se observaron trombos y abundantes detritus celulares. Las células endoteliales en estos puntos se encontraban tumefactas, con los núcleos picnóticos y algunas de ellas, desprendidas en la luz vascular.

Los septos interalveolares presentaban también una intensa hiper celularidad con características semejantes a las expuestas en el lote anterior, destacando un mayor número de células en necrosis y detritus celulares localizados libres o en el interior de macrófagos. Los megacariocitos se observaron con mayor frecuencia que en los lotes anteriores; en la luz broncoalveolar sólo se evidenciaron algunas células epiteliales.

#### **IV.1.7 OBSERVACIONES EN RIÑÓN.**

##### **LOTE I (2 dpi).**

Este órgano sólo mostró una moderada hiperemia en los vasos glomerulares e intersticiales, fundamentalmente de la corteza renal. En los espacios capsulares se observó una ligera cantidad de material acidófilo homogéneo. Las estructuras de la zona medular no presentaron ninguna alteración con respecto a las observaciones en los animales control.

##### **LOTE II (4 dpi).**

Los glomérulos mostraron una hiperemia más marcada con respecto al lote anterior, e igualmente en la cápsula de Bowman se presentaron glóbulos acidófilos y homogéneos en escaso número. Las células epiteliales de la cápsula se observaron tumefactas en algunos de estos glomérulos en los que algunas células mononucleares glomerulares e intersticiales mostraron hiperchromatosis cortical y/o picnosis nuclear.

En la zona medular se observaron algunas necrosis y células degeneradas aisladas en el intersticio peritubular.

##### **LOTE III (6 dpi).**

Junto a una hiperemia glomerular marcada, se observaron algunas células mesangiales y/o monocitos circulantes con hiperchromatosis cortical. En el tejido intersticial cortical y medular se presentó una ligera edematización con algunos macrófagos peritubulares con signos de degeneración y necrosis. Las células epiteliales de algunos túbulos proximales y distales se mostraban tumefactas haciendo prominencia en la luz.

##### **LOTE IV (7 dpi\* - 8 dpi).**

Los glomérulos renales del animal sacrificado a los 8 dpi presentaron células mononucleares con hiperchromatosis cortical de localización mesangial y/o intravascular. Las membranas basales se encontraban ligeramente engrosadas con material acidófilo homogéneo y las células epiteliales capsulares tumefactas en algunos glomérulos.

Los macrófagos intersticiales proliferaron tanto en la zona cortical como en la medular



mostrando signos degenerativos y necróticos.

En los túbulos proximales y distales se observaron glóbulos acidófilos homogéneos y vacuolización de las células epiteliales, alguna de las cuales se observó desprendida en la luz tubular.

El animal muerto (7 dpi) presentó una intensa hiperemia glomerular, así como hemorragias glomerulares e intersticiales multifocales tanto en la zona cortical como medular. Los glomérulos mostraron una marcada hiperemia con numerosas hemorragias y trombos hialinos asociados a células en degeneración y necrosis.

En el intersticio se presentaron abundantes macrófagos con hipercromatosis cortical, picnosis, cariorrexis y cariólisis, junto a lesiones de los capilares intersticiales con hemorragias y un marcado edema intertubular. Muchos de estos capilares presentaron trombos hialinos y células endoteliales, en aquellos casos en que fue posible su diferenciación, con vacuolización y/o picnosis nuclear.

Los túbulos presentaron cilindros hialinos y procesos degenerativo-necróticos en el epitelio haciendo protusión y descamándose en la luz, especialmente en las áreas con lesiones intersticiales más intensas.

#### **LOTE V (10 dpi).**

Los riñones de estos cerdos mostraron lesiones vasculares intensas, con distribución multifocal. Los glomérulos mostraban una intensa hiperemia con numerosas células mononucleares circulantes en degeneración y/o necrosis, así como un ligero engrosamiento de las membranas basales y líquido serohemorrágico en la cápsula de Bowman. Otros glomérulos presentaron microtrombos hialinos y extravasación de eritrocitos. En estos capilares las células endoteliales observables evidenciaron signos de necrosis.

En el tejido intersticial predominaron los fenómenos vasculares caracterizados por hiperemia, edema y hemorragias; y los cambios celulares más manifiestos fueron observados en los histiocitos y macrófagos con procesos degenerativo-necróticos, junto a los que se observaron algunos neutrófilos y eosinófilos.

---

Los túbulos de las áreas cortical y medular presentaron numerosos cilindros hialinos y células epiteliales vacuolizadas con algunos núcleos picnóticos y un marcado edema peritubular principalmente, en las zonas medulares

**LOTE VI (12 dpi).**

En este lote los procesos lesionales vasculares, tanto glomerulares como intersticiales, fueron menos intensos. Sin embargo se mantuvieron los cambios observados a los 8 dpi, con necrosis de células mononucleares a nivel glomerular, ligero engrosamiento de las membranas basales y un ligero exudado muy acidófilo en la cápsula de Bowman.

Los cambios vasculares en el intersticio periglomerular y peritubular se caracterizaron por un edema moderado y la presencia de macrófagos con signos de degeneración y necrosis y algunos leucocitos polimorfonucleares. Los fenómenos de microtrombosis no fueron tan prominentes como en el lote anterior, ni tampoco los cambios en el epitelio tubular.

## IV.II. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO.

### IV.2.1. DISTRIBUCIÓN DE LA PROTEÍNA VÍRICA PV73.

#### IV.2.1.1 TONSILAS.

El antígeno (PV73) no fue demostrado hasta los 4 dpi observándose en un escaso número de células mononucleares circulantes y en algunos histiocitos/ macrófagos perifoliculares. Estas células mostraron una positividad citoplasmática difusa con marginación periférica de la cromatina.

A los 6 dpi escasos restos celulares y macrófagos intersticiales presentaban positividad citoplasmática difusa, mostrando éstos marginación periférica de la cromatina. En las áreas periféricas de los folículos se presentaron algunas células mononucleares positivas.

A los 8 dpi se observaron abundantes células inmunorreactivas en el epitelio de las criptas, en muchas de ellas, en forma de cuerpo de inclusión. También las células descamadas mostraron una clara inmunopositividad no pudiendo, morfológicamente, definirse el tipo de célula epitelial o macrofágica. La positividad en los restos celulares fue muy abundante en el animal muerto (7 dpi). Las áreas foliculares y perifoliculares presentaron igualmente numerosas células mononucleares positivas.

La inmunorreactividad a los 10 dpi fue muy escasa en las células epiteliales de las criptas. Las áreas perifoliculares y foliculares mostraron un patrón de distribución de la PV73 similar al lote anterior pero, con un menor número de células. En cambio, a los 12 dpi las células epiteliales de las criptas volvieron a mostrar una intensa positividad difusa y en forma de cuerpo de inclusión. Los folículos linfoides y áreas perifoliculares también evidenciaron un mayor número de células inmunorreactivas.

Con la utilización de la elución aumentaron significativamente el número de macrófagos intersticiales y monocitos inmunorreactivos en los animales sacrificados a partir del 8 dpi, igualmente, con esta técnica aumentaron los macrófagos foliculares y las células epiteliales con

PV73 a los 8 y 10 dpi.

Con la utilización de cortes seriados y la técnica inmunohistológica de doble marcaje se observó que, las células del epitelio de las criptas tonsilares que mostraban inmunorreacción positiva con el MoAb anti-PV73, presentaban igualmente inmunorreactividad con el anticuerpo anti-queratina *RCK-102*, comprobándose de esta forma la infección de algunas células epiteliales por el VPPA.

#### **IV.2.1.2 GANGLIOS LINFÁTICOS.**

A los 2 dpi los ganglios mediastínicos, gastrohepáticos y renales presentaron células mononucleares circulantes en los senos subcapsulares y trabeculares con inmunopositividad citoplasmática difusa, alguna de estas células presentaron marginación periférica de la cromatina.

A los 4 dpi se observaron células mononucleares con positividad difusa y algunas en forma de cuerpo de inclusión en los senos linfáticos y entre el tejido linfoide difuso, estas células correspondían a monocitos y a macrófagos fijos y libres en los que se observaron frecuentes imágenes de hemoadsorción.

A los 6 dpi las células mononucleares inmunorreactivas fueron encontradas en los senos linfáticos, tejido linfoide difuso y, en menor medida, en las áreas más periféricas de los folículos de los ganglios mandibular y gastrohepático. Estas células presentaron positividad difusa y en forma de cuerpo de inclusión, observándose además en restos celulares.

A los 8 dpi los ganglios mediastínicos y mandibulares presentaron restos necróticos y células mononucleares inmunorreactivas en los senos subcapsulares. En los senos trabeculares se apreciaron células mononucleares con positividad preferentemente en forma de cuerpo de inclusión. En el tejido linfoide difuso y en los folículos linfoides se presentaron algunas células mononucleares y restos celulares inmunorreactivos.

En los ganglios gastrohepáticos y renales, las zonas de necrosis y hemorragias

---

presentaron numerosos macrófagos con positividad citoplasmática difusa y en forma de cuerpo de inclusión. En estas áreas y en escaso número también se observaron neutrófilos inmunopositivos, que de forma constante aparecían en las zonas más lesionadas. Los folículos linfoides presentaban restos necróticos y escasas células mononucleares inmunopositivas.

La inmunorreactividad a los 10 dpi aumentó paralelamente a la intensidad de las lesiones en los ganglios gastrohepático y renal. Asociadas a los focos de necrosis y hemorragias en los senos linfáticos, se observaron células mononucleares libres y fijas, restos celulares y escasos neutrófilos inmunopositivos. En el tejido linfoide difuso y en la periferia de los folículos linfoides aparecieron escasas células mononucleares con marginación periférica de la cromatina y positividad difusa y en forma de cuerpo de inclusión.

Los ganglios mandibulares y mediastínicos de los animales sacrificados a los 12 dpi presentaron numerosas células inmunorreactivas en las áreas de necrosis subcapsulares y peritrabeculares. Estas células con marcados signos de degeneración aparecieron positivas así como restos celulares y neutrófilos. En el tejido linfoide difuso y en los folículos linfoides, aparecieron escasas células mononucleares positivas.

En los ganglios gastrohepáticos y renales se observaron macrófagos, restos necróticos y algunos neutrófilos inmunorreactivos asociados de forma constante a las zonas de necrosis. En el tejido linfoide difuso y en los folículos se presentaron escasas células mononucleares con positividad difusa y en forma de cuerpo de inclusión con la misma distribución periférica descrita en el lote anterior.

En estos animales, así como en el animal muerto a los 7 dpi, se observaron algunas células fusiformes semejantes a fibroblastos en las trabéculas ganglionares presentando positividad citoplasmática difusa y marginación periférica de la cromatina.

Los monocitos y macrófagos de los senos linfáticos y tejido linfoide difuso conteniendo PV73 aumentaron considerablemente al aplicar la técnica de elución de anticuerpos en los animales sacrificados a los 8, 10 y 12 dpi.

#### IV.2.1.3 B A Z O.

La PV73 se observó en escasos macrófagos libres y/o fijos a los 2 dpi. La mayor parte de las células inmunorreactivas se concentraban en las zonas marginales y alrededor de los capilares envainados.

A los 4 dpi se presentaron abundantes células macrofágicas inmunorreactivas mostrando tanto positividad difusa como en forma de cuerpo de inclusión en su citoplasma. La mayoría de estas células evidenciaron signos de degeneración caracterizados por marginación periférica de la cromatina y algunas, picnosis y cariorexix. Estas células fueron observadas en mayor proporción en las zonas perifoliculares, alrededor de los capilares envainados y de forma difusa por la pulpa esplénica roja.

Las células reconocidas como monocitos y macrófagos inmunorreactivos presentaron, especialmente en la PER, fenómenos de hemoadsorción, muy pocos neutrófilos se detectaron conteniendo la PV73 estando localizados éstos principalmente en las áreas de necrosis.

La distribución de la PV73 a los 6 dpi fue similar a la observada en el lote anterior, con la diferencia de que numerosos macrófagos inmunopositivos presentaban simultáneamente restos celulares fagocitados. Las zonas más periféricas de los folículos linfoides presentaban restos celulares positivos, rodeados de algunas células mononucleares inmunorreactivas.

A los 8 dpi y a los 7 dpi (animal muerto), la inmunorreacción se detectó en las mismas zonas que en el lote anterior, con la particularidad de que a los 7 dpi, ésta estaba asociada a restos necróticos, muy abundantes en el bazo de este animal. Además se observaron numerosos macrófagos y algunos neutrófilos inmunorreactivos entre el material necrótico y las hemorragias.

La PV73 se demostró en células mononucleares libres y fijas de la pulpa esplénica roja, en las zonas marginales y en las áreas próximas a los capilares envainados de los cerdos sacrificados a los 10 dpi. Estas células presentaban positividad difusa y en forma de cuerpo de inclusión con signos de degeneración y necrosis. En la pulpa esplénica blanca se observó positividad en algunos restos necróticos y en escasas células mononucleares con marginación



periférica de la cromatina.

A los 12 dpi se observaron numerosos macrófagos positivos en las zonas marginales perifoliculares, alrededor de capilares envainados y mayoritariamente, distribuidas de forma difusa en pulpa esplénica roja. En los folículos linfoides se observó la inmunorreacción en células mononucleares, restos celulares y algunos polimorfonucleares.

#### **IV.2.1.4 MÉDULA ÓSEA.**

En la médula de los animales sacrificados a los 2 dpi no se demostró antígeno (PV73) con las técnicas inmunohistoquímicas empleadas. Sin embargo, y a los 4 dpi, se detectaron algunas células mononucleares circulantes y fijas, con inmunopositividad citoplasmática difusa y en forma de cuerpo de inclusión. Algunas células que, atendiendo a su morfología, se clasificaron como mieloides y/o neutrófilos presentaban también una positividad débil en el citoplasma.

La inmunorreactividad a los 6 dpi se observó en los mismos elementos celulares indicados anteriormente, con la particularidad de que esta reacción también se presentó en restos celulares y, en algunos megacariocitos con signos degenerativos.

En el animal sacrificado a los 8 dpi las células inmunorreactivas correspondieron mayoritariamente a células mononucleares libres o fijas, muchas de ellas en degeneración. Tanto los restos celulares como escasos mielocitos/ neutrófilos presentaron inmunorreactividad citoplasmática. El número de megacariocitos positivos aumentó considerablemente en este animal a diferencia de los observados en el animal muerto (7 dpi) en el que la positividad se encontró en restos necróticos y en células mononucleares libres.

A los 10 dpi el patrón de distribución de la PV73 fue prácticamente idéntico al del animal sacrificado a los 8 dpi. El número de células mononucleares conteniendo antígeno PV73 a los 12 dpi fue similar al lote anterior, destacando en este sentido, la presencia de un menor número de megacariocitos positivos.

Con la técnica de elución de anticuerpos aumentó considerablemente el número de monocito/ macrófagos inmunorreactivos a los 8 y 10 dpi, siendo de destacar el aumento de inmunopositividad en este último lote en el que además se observaron numerosos megacariocitos inmunorreactivos al utilizar esta técnica.

#### IV.2.1.5 HÍGADO.

Al igual que en otros órganos, en el hígado no se observó inmunorreacción específica hasta los 4 dpi cuando se detectaron monocitos circulantes y células de Kupffer con positividad mayoritariamente difusa y algunas, en forma de cuerpo de inclusión. Las células de Kupffer inmunorreactivas fueron más numerosas en las áreas perilobulillares, mostrando al igual que algunos monocitos fenómenos de hemoadsorción. En estos animales algunos histiocitos y/o macrófagos presentaron positividad citoplasmática difusa en las áreas portales e interlobulillares.

La distribución de la PV73 a los 6 dpi fue similar a la observada en el lote anterior si bien, el número de células inmunorreactivas presentaron, con mayor frecuencia, procesos de necrosis correspondiendo a células de Kupffer y a células mononucleares circulantes.

A los 8 dpi se observaron abundantes células mononucleares, restos necróticos y neutrófilos inmunorreactivos. Los primeros se correspondieron con monocito/ macrófagos circulantes y células de Kupffer distribuidas de forma difusa por todo el lobulillo. En el animal muerto (7 dpi) y en el sacrificado (8 dpi) fueron numerosos los macrófagos intersticiales positivos que se localizaron en el infiltrado celular periportal. Igualmente, el animal muerto mostró numerosos hepatocitos positivos en las regiones perilobulillares. En este animal se detectaron algunas células del epitelio biliar inmunorreactivas en forma de cuerpo de inclusión.

La inmunorreactividad a los 10 dpi disminuyó en ambos cerdos con respecto al animal muerto del lote anterior, localizándose fundamentalmente en monocitos circulantes, histiocitos y células de Kupffer. A los 12 dpi se observaron abundantes monocito/ macrófagos circulantes, células de Kupffer e histiocito/ macrófagos intersticiales con positividad difusa y en forma de

cuerpo de inclusión. Hepatocitos aislados o en pequeños grupos también mostraron positividad difusa y en forma de cuerpo de inclusión sin un patrón evidente dentro de los lobulillos.

El número de células de Kupffer y monocitos inmunorreactivos a la PV73 aumentó significativamente al utilizar la elución como pretratamiento en los animales sacrificados a partir de los 7 dpi; igualmente, los macrófagos intersticiales inmunopositivos con esta técnica aumentaron a los 8 y 12 dpi con respecto a los hígados en los que no se aplicó la elución.

#### IV.2.1.6 PULMÓN.

La inmunorreactividad específica fue observada a partir de los 4 dpi, con localización intracitoplasmática en células mononucleares de los septos interalveolares. La distribución y localización del antígeno PV73 fue idéntica a los 6 dpi, con la diferencia de observarse una mayor intensidad en las lesiones de las células inmunorreactivas.

A los 8 dpi las células inmunorreactivas correspondían fundamentalmente a células mononucleares de los septos interalveolares, muchas de ellas mostraban evidentes signos citopáticos, y se asociaban a restos celulares y neutrófilos. Algunos histiocitos y/o macrófagos perivasculares también presentaron positividad citoplasmática difusa o en forma de cuerpo de inclusión. En el pulmón del animal muerto se observó la presencia de un megacariocito inmunopositivo, así como en todos los elementos descritos en el animal sacrificado a los 8 dpi.

El patrón de distribución de la PV73 a los 10 dpi fue similar a la observada en el lote anterior (8 dpi) quedando limitada éste a células del tipo monocito/ macrófago localizados intra o perivascularmente. A los 12 dpi se apreciaron abundantes células mononucleares intravasculares con positividad difusa y en forma de cuerpo de inclusión. Estas células presentaban marginación periférica de la cromatina mientras otras, se encontraban en necrosis. En estos animales los restos celulares y los neutrófilos circulantes con inmunorreactividad fueron superiores a los del lote anterior.

Utilizando como pretratamiento la elución de anticuerpos, aumentó el número de monocito/ macrófagos inmunorreactivos en los septos alveolares de los animales sacrificados a

los 8 y 12 dpi.

#### IV.2.1.7 RIÑÓN.

Las primeras células que presentaron inmunopositividad se detectaron a los 4 dpi, éstas fueron un número muy reducido de células mononucleares localizadas en los glomérulos. Algunos monocitos y macrófagos intersticiales intertubulares de la corteza renal también presentaron positividad difusa y en forma de cuerpo de inclusión mostrando, simultáneamente, marginación periférica de la cromatina.

El número de células positivas se incrementó ligeramente en las mismas localizaciones en los cerdos sacrificados a los 6 dpi. Sin embargo y a los 8 dpi, además de las células mononucleares con positividad difusa en los glomérulos, se detectaron numerosos macrófagos intersticiales, monocitos circulantes intravasculares y restos celulares del tejido intersticial intertubular. En el animal muerto (7 dpi) y a nivel intersticial, se observaron algunas células inmunopositivas, que por su morfología corresponderían a células endoteliales con signos de degeneración. Igualmente, y en el mismo animal, se observaron escasas células epiteliales tubulares con inmunopositividad citoplasmática difusa.

En los cerdos sacrificados a los 10 dpi, la inmunopositividad disminuyó con respecto al animal sacrificado a los 8 dpi estando aquella presente en los mismos tipos celulares. No fue observado antígeno vírico en los microtrombos glomerulares. A los 12 dpi, aumentó el número de células inmunopositivas con localización intersticial cortical y medular, así como en los glomérulos; estas células correspondían a células macrofágicas y, en escaso número, células epiteliales y endoteliales.

Con la utilización de la elución aumentó considerablemente el número de células inmunopositivas a la PV73 estando éstas representadas por monocito/ macrófagos en el riñón de todos los animales a los que se aplicó esta técnica. Igualmente, aumento la inmunopositividad en las células endoteliales de los animales sacrificados a los 10 dpi y en las células mesangiales de los animales sacrificados a los 8 dpi.

TABLA 1: DISTRIBUCIÓN DE LA PROTEÍNA PV73 (I).

	2 DPI	4 DPI	6 DPI	7°-8 DPI	10 DPI	12 DPI
<b>TONSILAS</b>						
Macrófagos PF.	-	+	+	++	+/+++	+++
Macrófagos F.	-	-	+	+	+	++
Monocitos	-	+	+	++	+/+++	+++
Céls. Epiteliales	-	-	-	++	+/-	++
Restos Celulares	-	-	+	++	+	++
<b>GANGLIOS LINFÁTICOS</b>						
Macrófagos PF.	-	+	+/+++	+++	+/+++	+++
Macrófagos F.	-	-	+	++	+	+/+++
Monocitos	+	+	+/+++	+++	+/+++	+++
Neutrófilos	-	-	+	++	+	++
Restos Celulares	-	-	+	++	+	++
<b>BAZO</b>						
Macrófagos PER.	+	+++	++	++	++	+++
Macrófagos PEB.	-	+	+/+++	++	+	++
Monocitos	+	+++	++	++	++	+++
Neutrófilos	-	+	+	+	+	+
Restos celulares	-	+	+/+++	++	+	++
<b>MÉDULA ÓSEA</b>						
Monocito/ Macróf.	-	++	++	+++	++	+++
Mielocitos	-	+/-	+	++	+/+++	++
Megacariocitos	-	-	+	++	++	+
Restos Celulares	-	+	+	++	+	+

PER: pulpa esplénica roja; PEB: pulpa esplénica blanca; PF: perifolicular; F: folicular; Macróf: macrófagos; Céls: células. Inters: Intersticiales; (-): negativo; (+/-): dudosa; (+): escasa; (+/+++): moderada; (++): abundante; (+++): muy abundante.

TABLA 2. DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA PV73 (II).

	2 DPI	4 DPI	6 DPI	7°-8 DPI	10 DPI	12 DPI
<b>HÍGADO</b>						
Monocito/ Cél. Kupffer	-	++	++	+++	+ / +++	+++
Macróf. Inters.	-	+	+	++	+	++
Hepatocitos	-	-	-	+	-	+
Neutrófilos	-	+	+	+	+	+
Restos Celulares	-	-	+	++	+	++
<b>PULMÓN</b>						
Macróf. Septales	-	+ / ++	+	+++	+	++
Macróf. Alveolares	-	-	-	-	-	-
Neutrófilos	-	-	-	+	-	+
Restos celulares	-	-	+	++	+	+
<b>RIÑÓN</b>						
Macróf. Inters.	-	+	+	+++	++	++
Monocitos	-	+	+	+++	++	++
Céls. Endoteliales	-	-	-	+	+	+
Céls. Epiteliales	-	-	-	+	+	+
Céls. Mesangiales	-	+	+	+	+	+
Restos celulares	-	-	-	++	+	+

TABLA 3. APLICACIÓN DE LA ELUCIÓN (I).

	SIN ELUCIÓN 7*-8 DPI	CON ELUCIÓN 7*-8 DPI	SIN ELUCIÓN 10 DPI	CON ELUCIÓN 10 DPI	SIN ELUCIÓN 12 DPI	CON ELUCIÓN 12 DPI
<b>TONSILAS</b>						
Macrófagos PF.	+	++	+/-	+	++	+++
Macrófagos F.	+	++	-	+	++	++
Monocitos	++	++	+/-	+	++	+++
Céls. Epiteliales	++	+++	-	+/-	++	++
Restos Celulares	++	++	+	+	++	++
<b>GANGLIOS LINFÁTICOS</b>						
Macrófagos PF.	++	+++	+	+ /+++	++	+++
Macrófagos F.	++	++	+	+	+ /+++	+ /+++
Monocitos	++	+++	+	+ /+++	++	+++
Neutrófilos	++	++	+	+	++	++
Restos Celulares	++	++	+	+	++	++
<b>BAZO</b>						
Macrófagos PER.	+	++	+	++	+++	+++
Macrófagos PEB.	++	++	+/-	+	++	++
Monocitos	+	++	+	++	+++	+++
Neutrófilos	+/-	+	+	+	+	+
Restos celulares	++	++	+	+	++	++
<b>MÉDULA ÓSEA</b>						
Monocito/ Macróf.	++	+++	+	++	++	+++
Mielocitos	++	++	+	+	++	++
Megacariocitos	++	++	+/-	++	+	+
Restos Celulares	++	++	+	+	+	+

**TABLA 4. APLICACIÓN DE LA ELUCIÓN (II).**

	SIN ELUCIÓN 7º-8 DPI	CON ELUCIÓN 7º- 8DPI	SIN ELUCIÓN 10 DPI	CON ELUCIÓN 10 DPI	SIN ELUCIÓN 12 DPI	CON ELUCIÓN 12 DPI
<b>HÍGADO</b>						
Monocito/ Cél. Kupffer	++	+++	+/-	+ /+++	++	+++
Macróf. Inters.	+	++	+	+	+	++
Hepatocitos	+	+	-	-	+	+
Neutrófilos	+	+	+/-	+	+	+
Restos Celulares	++	++	+	+	++	++
<b>PULMÓN</b>						
Macróf. Septales	++	+++	+	+	+	++
Macróf. Alveolares	-	-	-	-	-	-
Neutrófilos	+	+	-	-	+	+
Restos celulares	++	++	+	+	+	+
<b>RIÑÓN</b>						
Macróf. Inters.	++	+++	+	++	+	++
Monocitos	++	+++	+	++	+	++
Cél. Endoteliales	+	+	+/-	+	+	+
Cél. Epiteliales	+	+	+	+	+	+
Cél. Mesangiales	-	+	+	+	+	+
Restos celulares	++	++	+	+	+	+



## IV.2.2. DISTRIBUCIÓN TISULAR DE LAS INMUNOGLOBULINAS (IgM, IgG e IgA) PORCINAS.

### IV.2.2.1 TONSILAS.

#### a. Inmunoglobulina IgM.

A los 2 dpi se observó inmunopositividad en el citoplasma de numerosas células epiteliales de las criptas tonsilares, estas células resultaron negativas a los 4 dpi volviendo a mostrar una intensa reacción a los 6 y 8 dpi, tanto en el epitelio como en los abundantes restos celulares localizados en las luces de las criptas y en algunas células linfoplasmocitarias de localización subepitelial.

En el animal muerto a los 7 dpi aumentó considerablemente la inmunopositividad en los detritus celulares localizados en las criptas incrementándose, igualmente, el número de células linfoplasmocitarias positivas. En las zonas interfoliculares aparecieron algunos macrófagos conteniendo IgM citoplasmática con características granulares.

A los 10 dpi el epitelio no mostró inmunopositividad pero ésta si se encontró en un número considerable de células linfoplasmocitarias subepiteliales. Los resultados positivos volvieron a evidenciarse en las células epiteliales y en un número elevado de células linfoplasmocitarias subepiteliales a los 12 dpi.

#### b. Inmunoglobulina IgG.

Este isotipo se presentó en un escaso número de células linfoplasmocitarias subepiteliales y en el plasma de pequeños vasos a los 2 dpi; a los 4 y 6 dpi, se observó adicionalmente esta inmunopositividad en algunas células epiteliales de las criptas tonsilares.

A los 8 dpi y 12 dpi, así como en el animal muerto a los 7 dpi se intensificó drásticamente la presencia de IgG en las células epiteliales descamadas, en los restos celulares del epitelio de las criptas y en escasos macrófagos.

A los 10 dpi la inmunorreacción quedó restringida a un moderado número de células

linfoplasmocitarias subepiteliales y a unas pocas células epiteliales.

### **c. Inmunoglobulina IgA.**

Utilizando este anticuerpo, únicamente se observó inmunorreacción en un escaso número de células linfoplasmocitarias a los 4, 8 y 12 días postinfección, siendo prácticamente negativas las células epiteliales en todos los animales sacrificados. Es de destacar que algunas células epiteliales y restos celulares en el animal muerto a los 7 dpi mostraron esta inmunoglobulina.

## **IV.2.2.2 GANGLIOS LINFÁTICOS.**

### **a. Inmunoglobulina IgM.**

A los 2 y 4 dpi la inmunopositividad con este anticuerpo se limitó a un moderado número de células linfoplasmocitarias presentes principalmente en las áreas próximas a las trabéculas y en menor medida, en el tejido linfoide difuso. El número de estas células aumentó considerablemente en los ganglios de los animales sacrificados a partir de los 6 dpi en las zonas perifoliculares.

A partir de los 8 dpi fueron observados algunos monocitos y macrófagos con inmunopositividad citoplasmática granular en los senos subcapsulares. En el animal muerto a los 7 dpi y en los animales sacrificados a los 12 dpi se encontró además IgM en restos celulares del tejido linfoide difuso.

### **b. Inmunoglobulina IgG.**

En un mayor número, que el observado para el isotipo IgM, se presentaron las células linfoplasmocitarias con una localización preferentemente peritrabecular en los animales sacrificados a los 2 y 4 días postinfección, adicionalmente, los animales sacrificados a los 6 dpi presentaron inmunopositividad asociada a restos celulares en las criptas tonsilares. A los 8 dpi aumentó la inmunoreactividad en estas zonas, detectándose macrófagos en los senos subcapsulares y en el tejido linfoide difuso con positividad citoplasmática granular. Estas mismas células fueron detectadas en los ganglios de los animales sacrificados a los 10 y 12 días postinoculación.

**c. Inmunoglobulina IgA.**

Al utilizar el anticuerpo monoclonal anti-IgA porcina, únicamente se detectó inmunopositividad en células linfoplasmocitarias en todos los animales y con una localización preferentemente peritrabecular.

**IV.2.2.3 BAZO.****a. Inmunoglobulina IgM.**

En los bazos de los animales sacrificados a los 2 y 4 días postinoculación, se observó un moderado número de células linfoplasmocitarias inmunorreactivas con localización peritrabecular y, en menor medida, perifolicular. A partir de los 6 dpi, aumentó el número de estas células positivas y se observaron macrófagos fijos y libres de la PER con positividad citoplasmática granular y difusa.

La inmunorreacción en los cerdos sacrificados a los 8, 10 y 12 dpi aumentó, si bien a los 7\* y a los 12 dpi se observó asociada a material necrótico.

**b. Inmunoglobulina IgG.**

En los animales sacrificados a los 2 dpi sólo se observó una moderada inmunorreactividad granular en el plasma sanguíneo.

A los 4 y 6 días postinoculación la inmunorreacción con este anticuerpo se presentó en células linfoplasmocitarias distribuidas por toda la pulpa esplénica roja, así como en macrófagos en degeneración y en restos celulares. En los animales sacrificados a partir de los 8 dpi se apreció, al igual que en los ganglios linfáticos, un aumento del número de células linfoplasmocitarias, macrófagos y restos celulares inmunorreactivas para la IgG.

**c. Inmuglobulina IgA.**

Con este anticuerpo monoclonal, únicamente se observaron células linfoplasmocitarias inmunorreactivas, aumentando éstas en los cerdos sacrificados a partir de los 6 dpi. En el animal encontrado muerto a los 7 dpi y en los sacrificados a los 12 dpi se observaron abundantes restos

celulares inmunopositivos.

#### **IV.2.2.4 MÉDULA ÓSEA.**

##### **a. Inmunoglobulina IgM.**

Este isotipo se observó únicamente en los animales sacrificados a partir de los 6 dpi, detectándose en células linfoplasmocitarias, monocitos y macrófagos así como en un escaso número de megacariocitos con signos de degeneración.

En los animales sacrificados a los 8 y 10 dpi la presencia de IgM, se encontró en un mayor número de estos mismos tipos celulares destacando, en el animal muerto a los 7 dpi, abundantes restos celulares inmunorreactivos.

En los animales sacrificados a los 12 dpi sólo fueron observadas células linfoplasmocitarias inmunorreactivas distribuidas por todo el órgano.

##### **b. Inmunoglobulina IgG.**

Los animales sacrificados a los 2 y 4 dpi presentaron inmunorreacción con el anticuerpo anti-IgM en el plasma y en escasas células linfoplasmocitarias en la médula ósea.

Al igual que el isotipo IgM, la positividad fue observada en macrófagos, células linfoplasmocitaria en número creciente y en algunos megacariocitos de los animales sacrificados a los 6, 8 y 10 dpi. Adicionalmente, el cerdo muerto a los 7 dpi y los sacrificados a los 12 dpi presentaron inmunopositividad asociada a numerosos restos celulares.

##### **c. Inmunoglobulina IgA.**

La presencia de esta inmunoglobulina en la médula ósea quedó restringida a las células linfoplasmocitarias con una distribución difusa en los animales sacrificados a los 4, 6 y 8 días postinfección, no demostrándose en los cerdos sacrificados con posterioridad.

#### **IV.2.2.5 HÍGADO.**

##### **a. Inmunoglobulina M.**

Escasas células linfoplasmocitarias del infiltrado inflamatorio presentaron inmunorreactividad con este anticuerpo a los 2 y 4 dpi; los animales sacrificados a los 6 dpi presentaron un progresivo aumento intersticial y periportal del número de células conteniendo IgM.

El animal muerto a los 7 dpi\* y los sacrificados a los 10 dpi presentaron inmunopositividad en el borde apical del epitelio biliar, en algunos monocitos, células de Kupffer y en escasos macrófagos intersticiales y neutrófilos.

En los animales sacrificados a los 12 dpi la IgM fue detectada únicamente en el plasma sanguíneo.

##### **b. Inmunoglobulina G.**

En el hígado de todos los animales se observó en los sinusoides hepáticos, un progresivo aumento del número de estructuras globulares circulantes inmunorreactivas, constituyendo estos elementos y algunas células linfoplasmocitarias intersticiales las únicas estructuras que presentaron inmunorreacción a los 2 dpi. Además de estos elementos, se observaron monocitos y/o células de Kupffer conteniendo IgG a los 4 dpi.

A partir de los 6 dpi, la inmunopositividad en las estructuras globulares y en las células aumentó, localizándose la IgG en el borde del epitelio biliar, en algunos macrófagos intersticiales y en restos celulares, éstos últimos particularmente frecuentes en el animal encontrado muerto a los 7 dpi y en los animales sacrificados a los 10 y 12 dpi.

##### **c. Inmunoglobulina IgA.**

Este isotipo fue observado en células linfoplasmocitarias infiltradas en el tejido intersticial hepático de todos los animales, aumentando el número de células positivas de forma paralela al progreso de la enfermedad. Igualmente, y a partir de los 4 dpi, se observó una intensa inmunorreacción fina y granular en el borde apical del epitelio biliar.

#### IV.2.2.6 PULMÓN.

##### a. Inmunoglobulina IgM.

En los animales sacrificados a los 2 y 4 dpi sólo se presentó inmunorreacción en el plasma sanguíneo, detectándose a los 6 dpi un escaso número de células mononucleares intravasculares en degeneración con inmunopositividad citoplasmática difusa.

En los animales sacrificados a los 8 dpi, se observó inmunopositividad escasa en la superficie apical del epitelio bronquial, en un mayor número de monocito/ macrófagos intravasculares y en restos celulares circulantes.

##### b. Inmunoglobulina IgG.

Al igual que el isotipo IgM, a los 2 y 4 dpi la positividad se presentó restringida principalmente al plasma intravascular. A partir de los 6 dpi y, particularmente intensa en el animal muerto y en los sacrificados a los 12 dpi, la IgG se visualizó en monocitos y macrófagos intravasculares, los cuales presentaron una inmunopositividad citoplasmática granular asociada en muchas de estas células a procesos de degeneración y necrosis.

La superficie apical del epitelio bronquial presentó una inmunorreacción granular en los animales sacrificados desde los 6 dpi y en el animal muerto a los 7 dpi\*.

##### c. Inmunoglobulina IgA.

En todos los pulmones, la inmunopositividad al utilizar el MoAb anti-IgA fue muy escasa, quedando ésta restringida a escasas células linfoplasmocitarias localizadas en los septos interalveolares así como en el borde apical del epitelio bronquial.

Con la utilización del anticuerpo anti-antígeno relacionado con el F-VIII se presentó una positividad granular en los microtrombos localizados en los vasos de los septos interalveolares.

#### IV.2.2.7 RIÑÓN.

##### a. Inmunoglobulina IgM.

A los 2 y 4 dpi se detectó la IgM en el plasma sanguíneo, tanto en los vasos glomerulares como intertubulares.

En los cerdos sacrificados a los 6 dpi, la inmunopositividad se detectó con distribución difusa en el mesangio y en zonas subendoteliales de los capilares glomerulares.

A los 8 dpi apareció una intensa inmunopositividad en los glomérulos, localizándose la IgM en las zonas subendotelial, subepitelial, en los trombos y en los cilindros hialinos y células epiteliales tubulares. Escasos macrófagos y restos celulares intertubulares presentaron IgM en este dpi.

A los 10 dpi la inmunopositividad apareció con caracter multifocal en los microtrombos de algunos glomérulos, así como en el mesangio y zonas subendoteliales. En menor medida, los macrófagos intersticiales, los restos celulares y las células linfoplasmocitarias intersticiales mostraron inmunorreacción. Por el contrario, los animales sacrificados a los 12 dpi mostraron una escasa inmunorreacción quedando ésta, limitada a alguna células linfoplasmocitarias intersticiales.

##### b. Inmunoglobulina G.

El plasma sanguíneo presentó una mayor intensidad en la inmunorreacción con este AcMo, en el mesangio con caracter difuso así como en la luz vascular y epitelio tubular a los 6 dpi.

En los animales sacrificados a los 8 y 10 dpi, la inmunopositividad en glomérulos se intensificó en las áreas mesangiales y en la periferia de los microtrombos así como en los cilindros hialinos y el epitelio de los túbulos. Algunos macrófagos intersticiales y restos celulares presentaron también IgG. Esta misma distribución fue observada en los animales sacrificados a los 12 dpi quedando restringida en este caso la inmunopositividad glomerular al mesangio y áreas subendoteliales de los glomérulos.

**c. Inmunoglobulina IgA.**

Con este anticuerpo sólo se detectaron algunas células linfoplasmocitarias diseminadas en el intersticio renal de los animales sacrificados a partir de los 8 dpi, siendo negativos los trombos de los glomérulos o de los vasos intersticiales de los animales sacrificados a los 7, 8, 10 y 12 dpi.

Con la utilización del antisuero anti-antígeno relacionado con el factor VIII de la coagulación se observó una inmunorreacción granular específica en los microtrombos localizados en los glomérulos e intersticio del animal muerto y los sacrificados a partir de los 8 dpi, asimismo, esta inmunorreacción se presentó en las áreas de hemorragias presentes en los riñones de estos animales.



TABLA 5. DISTRIBUCIÓN DE LAS INMUNOGLOBULINAS PORCINAS (I).

TONSILA		2 dpi.	4 dpi.	6 dpi.	7*-8 dpi.	10 dpi.	12 dpi.
Epitelio/ Descamación epitelial	IgM	++	-	++	++	-	++
	IgG	+/-	+	+	++	+/-	++
	IgA	-	-	-	+	-	-
Monocito/ Macrófagos	IgM	-	-	-	+	-	-
	IgG	-	-	-	+	-	+
	IgA	-	-	-	-	-	-
Cél. linfo-plasmocitarias	IgM	-	-	+	++	++	++
	IgG	+	+	+	++	++	++
	IgA	-	+	-	+	-	+
Plasma	IgM	+/-	+/-	+	++	++	++
	IgG	+	+	++	++	++	++
	IgA	-	-	-	-	-	-
<b>GANGLIOS LINFÁTICOS</b>							
Monocito/ Macróf. subcapsulares	IgM	-	-	-	+	+	+
	IgG	-	-	-	++	++	++
	IgA	-	-	-	-	-	-
Macróf. Tejido linfoide difuso	IgM	-	-	-	+	-	+
	IgG	-	-	-	+	+	+
	IgA	-	-	-	-	-	-
Cél. linfo-plasmocitarias	IgM	+	+	++	++	++	++
	IgG	+ /+++	+ /+++	++	++	++	++
	IgA	+/-	+	++	++	++	++
Plasma	IgM	+/-	+/-	+	++	++	++
	IgG	+	+	++	++	++	++
	IgA	-	-	-	-	-	-
<b>BAZO</b>							
Monocito/ Macrófagos	IgM	-	-	+	+	+	+
	IgG	-	+	+	+	+	+
	IgA	-	-	-	-	-	-
Cél. linfo-plasmocitarias	IgM	+	++	++	+	++	++
	IgG	-	+	+	++	++	++
	IgA	+/-	+/-	+	++	++	+
Plasma	IgM	+/-	+/-	+	++	++	++
	IgG	+	+	++	++	++	++
	IgA	-	-	-	-	-	-
<b>MÉDULA ÓSEA</b>							
Monocito/ Macrófagos	IgM	-	-	+	++	++	-
	IgG	-	-	+	+	+	+
	IgA	-	-	-	-	-	-
Cél. linfo-plasmocitarias	IgM	-	-	+	++	++	-
	IgG	+	+	+	++	++	++
	IgA	-	+	+	+	-	-
Megacariocitos	IgM	-	-	+	+	+	-
	IgG	-	-	-	-	-	+
	IgA	-	-	-	-	-	-
Plasma	IgM	+/-	+/-	+	++	++	++
	IgG	+	+	++	++	++	++
	IgA	-	-	-	-	-	-

TABLA 6. DISTRIBUCIÓN DE INMUNOGLOBULINAS PORCINAS (II).

<b>HÍGADO</b>		2 dpi	4 dpi	6 dpi	7*-8 dpi	10 dpi	12 dpi
Monocito/ Cél. Kupffer	IgM	-	-	-	+	+	-
	IgG	-	+	+/++	++	+	++
	IgA	-	-	-	-	-	-
Macróf. intersticiales	IgM	-	-	-	+	+	-
	IgG	-	-	+	+	+	+
	IgA	-	-	-	-	-	-
Cél. linfo-plasmocitarias	IgM	+	+	+/++	++	++	++
	IgG	+	+	++	++	++	++
	IgA	+	+	++	++	++	++
Epitelio biliar	IgM	-	-	-	+	+	-
	IgG	-	-	+	+	+	+
	IgA	-	+	++	++	++	++
Plasma	IgM	+/-	+/-	+	++	++	++
	IgG	+	+	++	++	++	++
	IgA	-	-	-	-	-	-
<b>PULMÓN</b>							
Macrófagos septales	IgM	-	-	+	+	+	+
	IgG	-	-	+	++	+	++
	IgA	-	-	-	-	-	-
Epitelio bronquial	IgM	-	-	-	+	+	+
	IgG	-	-	+	+	+	+
	IgA	-	+	+	+	+	+
Plasma	IgM	+/-	+/-	+	++	++	++
	IgG	+	+	++	++	++	++
	IgA	-	-	-	-	-	-
<b>RIÑÓN</b>							
Mesangio/ Membrana basal	IgM	-	-	+	+/+++	++	-
	IgG	-	-	+	++	++	++
	IgA	-	-	-	-	-	-
Trombos	IgM	-	-	-	+	++	-
	IgG	-	-	-	-	-	-
	IgA	-	-	-	-	-	-
Epitelio tub./ cilindros hialinos	IgM	-	-	-	++	+	-
	IgG	-	-	+	++	++	+
	IgA	-	-	-	-	-	-
Macrófagos intersticiales	IgM	-	-	-	+	+	-
	IgG	-	-	-	+	+	+
	IgA	-	-	-	-	-	-
Plasma	IgM	+/-	+/-	+	++	++	++
	IgG	+	+	++	++	++	++
	IgA	-	-	-	-	-	-

IV.3. ESTUDIO HEMATOLÓGICO.

IV.3.1. Los resultados obtenidos en el recuento de hematíes se exponen en la siguiente tabla:

ANIMAL	2 dpi.	4 dpi.	6 dpi.	8 dpi.	10 dpi.	12 dpi
1	ND					
2	4873300*					
3		5648700				
4		4609300				
5			6080190			
6			5257100			
7				5657250		
8				ND		
9					5515850	
10					5548330	
11						6218500
12						4929100

\*: los valores están expresados por ml. de sangre. Los valores medios de los cerdos control oscilan entre  $5 \times 10^9$  y  $8 \times 10^9$ .

IV.3.2. Los resultados obtenidos en el recuento de leucocitos se expresan en la siguiente tabla:

ANIMAL	2 dpi.	4 dpi.	6 dpi.	8 dpi.	10 dpi.	12 dpi
1	ND					
2	16807*					
3		8562				
4		12413				
5			10849			
6			10292			
7				10181		
8				ND		
9					9500	
10					10010	
11						17112
12						14820

\*: los valores están expresados por ml. de sangre.

Los valores medios en los animales control oscilan entre  $16 \times 10^3$  y  $17 \times 10^3$ .

IV.3.3. Los resultados obtenidos en el recuento de plaquetas son expuestos en la siguiente tabla:

ANIMAL	2 dpi.	4 dpi.	6 dpi.	8 dpi.	10dpi.	12dpi.
1	ND					
2	605000*					
3		597000				
4		513000				
5			168000			
6			467000			
7				45000		
8				ND		
9					19000	
10					26000	
11						385000
12						155000

\*: los valores están expresados por ml. de sangre.

Los medios en los animales control oscilan entre  $32 \times 10^4$  y  $72 \times 10^4$ .

IV.3.4. Los resultados de la viremia vienen representados en la siguiente tabla:

LOTE	ANIMAL	VIREMIA*
I	1	3.19
	2	2.43
II	3	7.32
	4	8.01
III	5	6.35
	6	8.19
IV	7	7.32
	8	ND
V	9	6.35
	10	7.02
VI	11	8.35
	12	7.35

\*: valores expresados como log HAD<sub>50</sub> por ml. de sangre.

En la tabla 8 exponemos la temperatura rectal de los cerdos empleados en este trabajo desde el día 2 de la inoculación hasta el día 12 postinoculación.

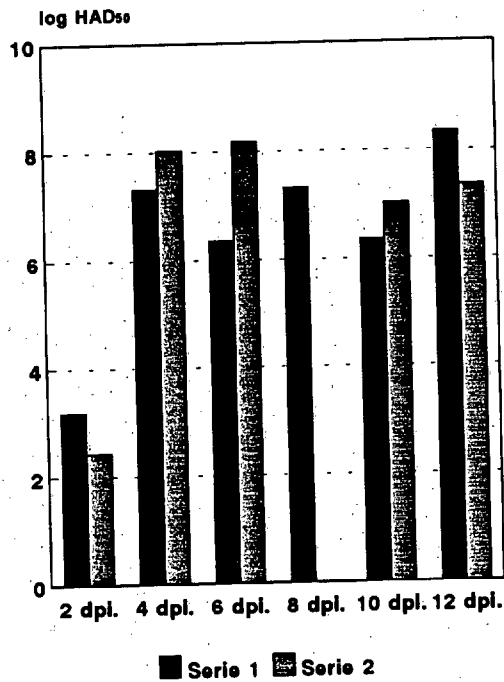
(TABLA 8)

-----DIAS PRE Y POSTINOCULACIÓN-----

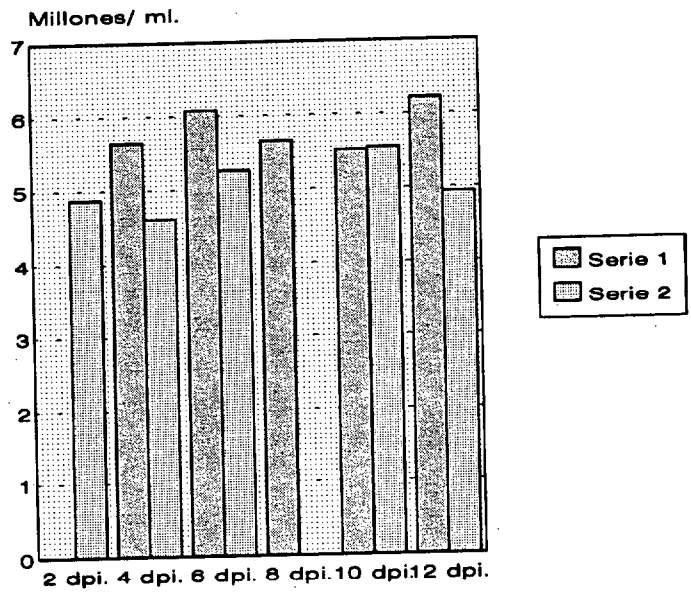
An im al	-2	-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	40.3*		40.0	39.9										
2	39.3		9.5	40.3										
3		39.4	38.2		41.4	41.1								
4		39.7	38.8		41.0	41.4								
5		39.8	37.5		39.5	40.9	41.7	41.1						
6		39.9	38.9		37.0	42.0	41.5	41.5						
7			39.7	40.7	40.5	40.7	40.7	41.3	41.5	41.0				
8	39.1		40.5	40.1	41.4	40.8	41.2	41.0	**					
9		40.0	38.2		39.3	40.5	42.1	41.3	41.5	40.8	40.4	39.1		
10		39.2	38.1		38.6	40.5	41.6	41.5	41.5	41.0	41.0	40.4		
11		39.4	37.3		40.0	39.6	40.5	40.5	40.3	40.7	40.0	41.3	40.5	40.5
12		39.8	38.3		41.4	40.0	40.3	40.3	39.2	40.4	41.2	41.5	41.0	41.7

\*: los valores estan expresados en grados centígrados.\*\*: animal encontrado muerto a los 7 dpi.

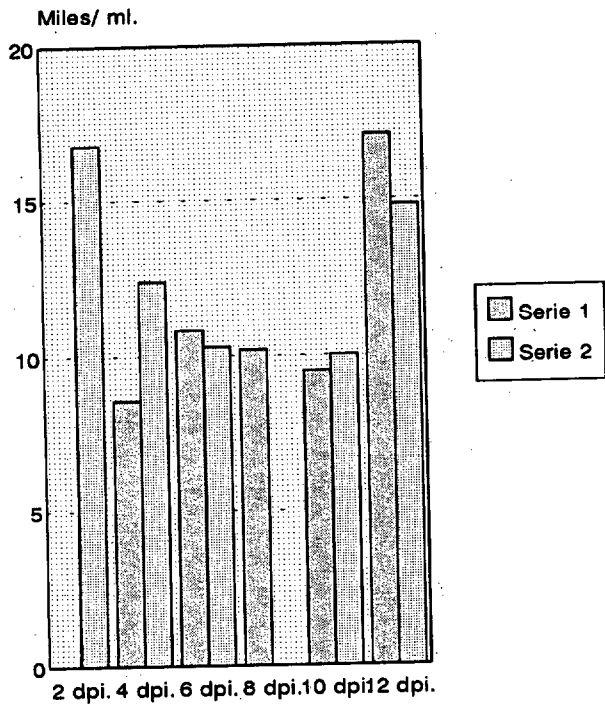
VIREMIA



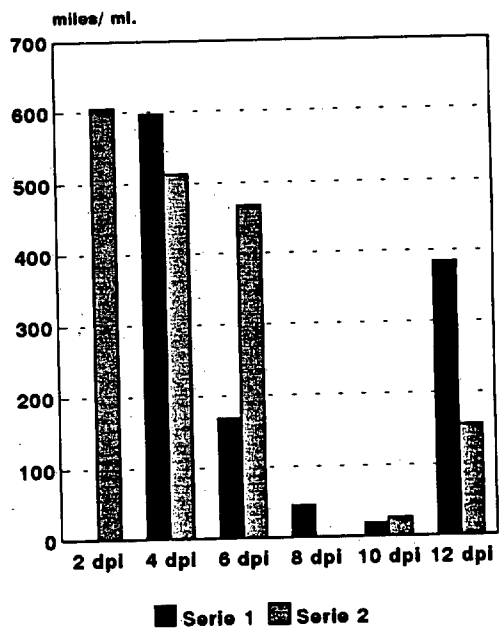
RECuento DE ERITROCITOS



RECuento DE LEUCOCITOS

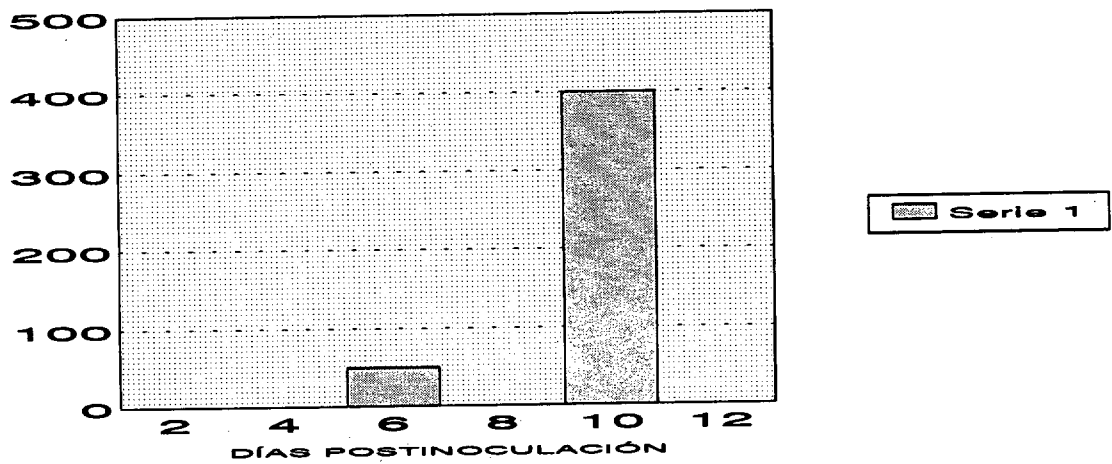
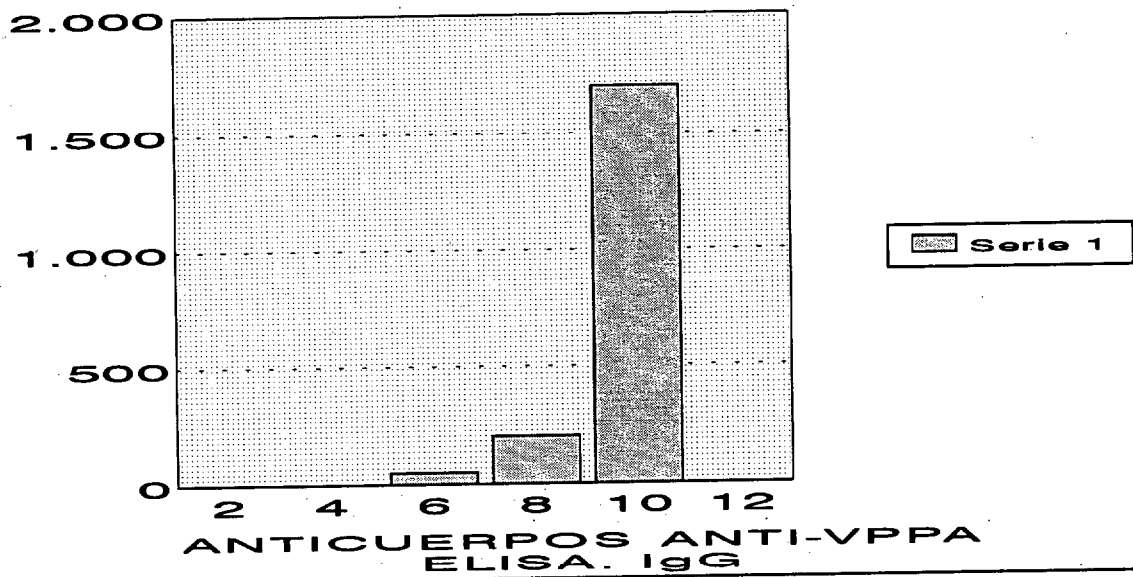
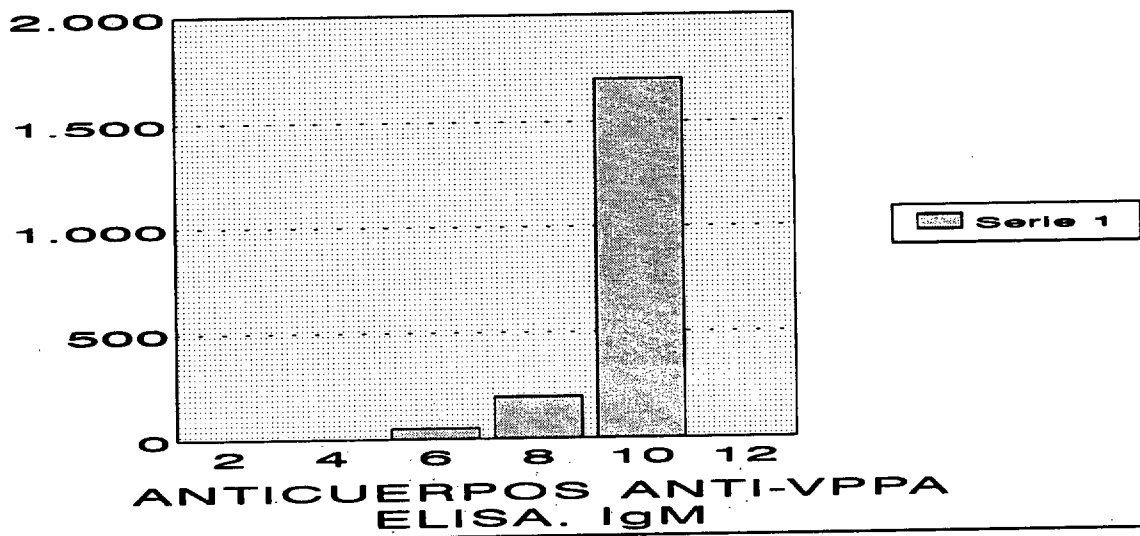


RECuento DE PLAQUETAS



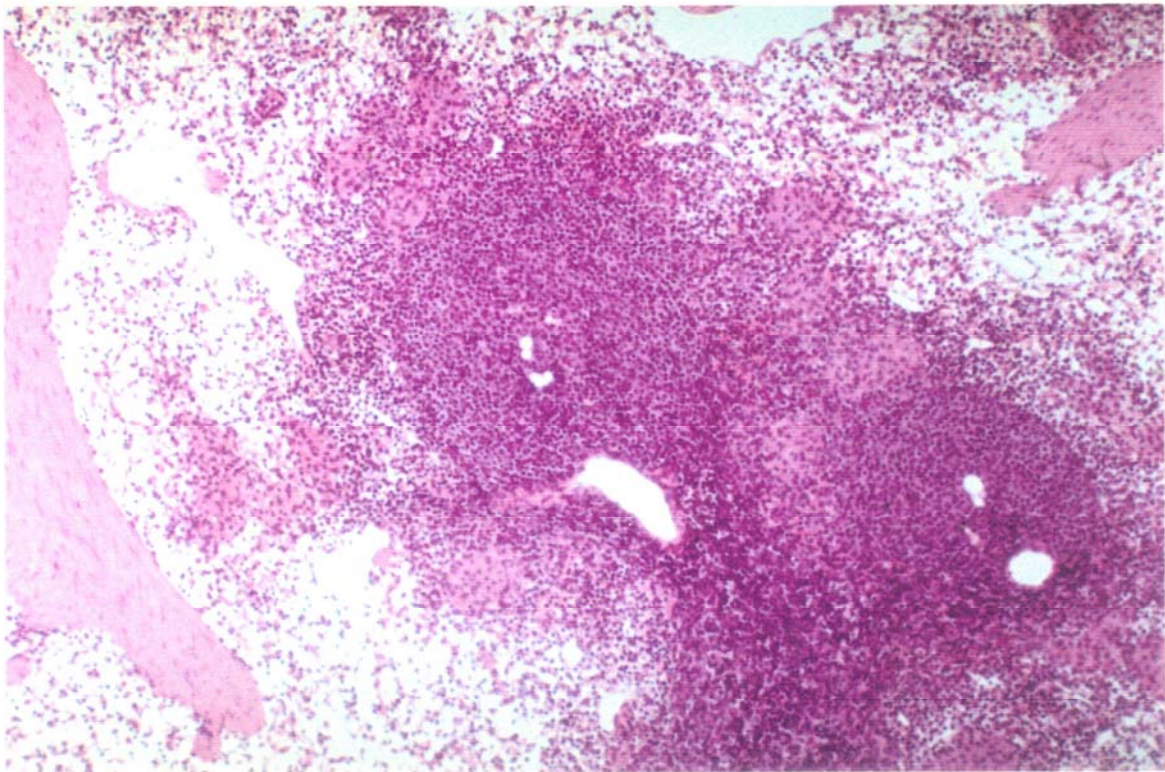
Serie 1: Animales perfundidos.  
Serie 2: Animales no perfundidos.

ANTICUERPOS ANTI-VPPA  
ELISA. IGA

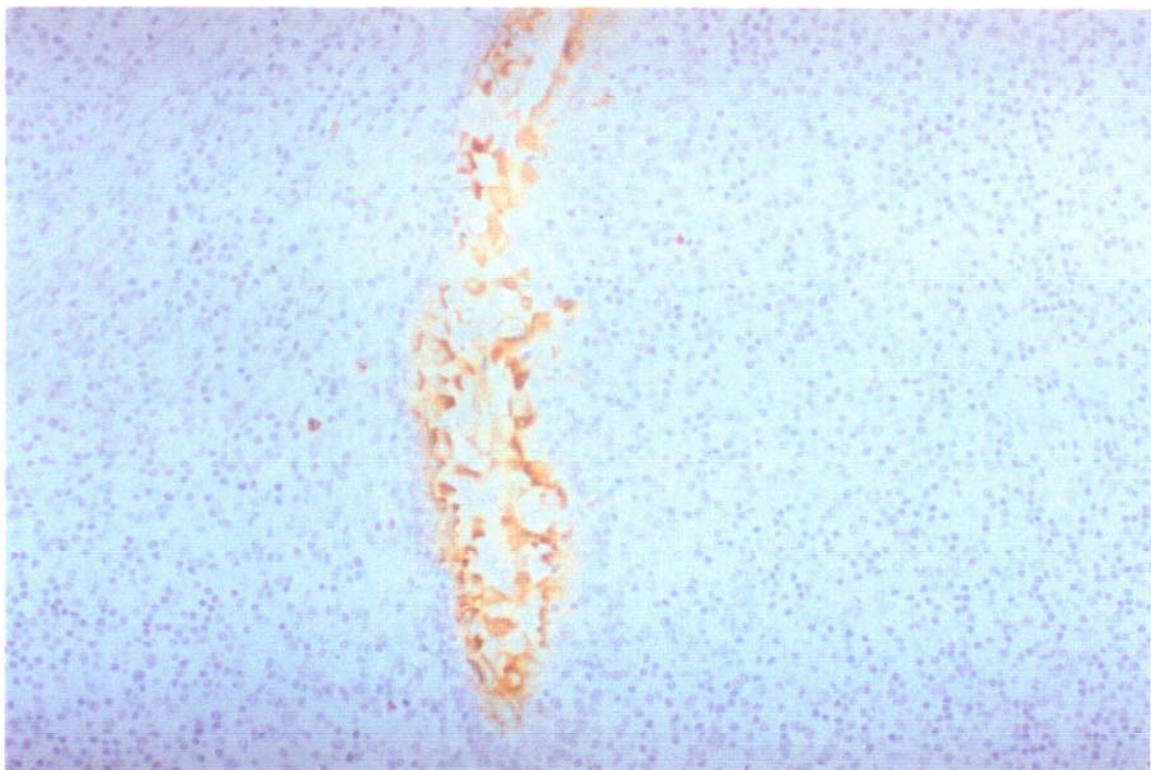


## V. ICONOGRAFÍA

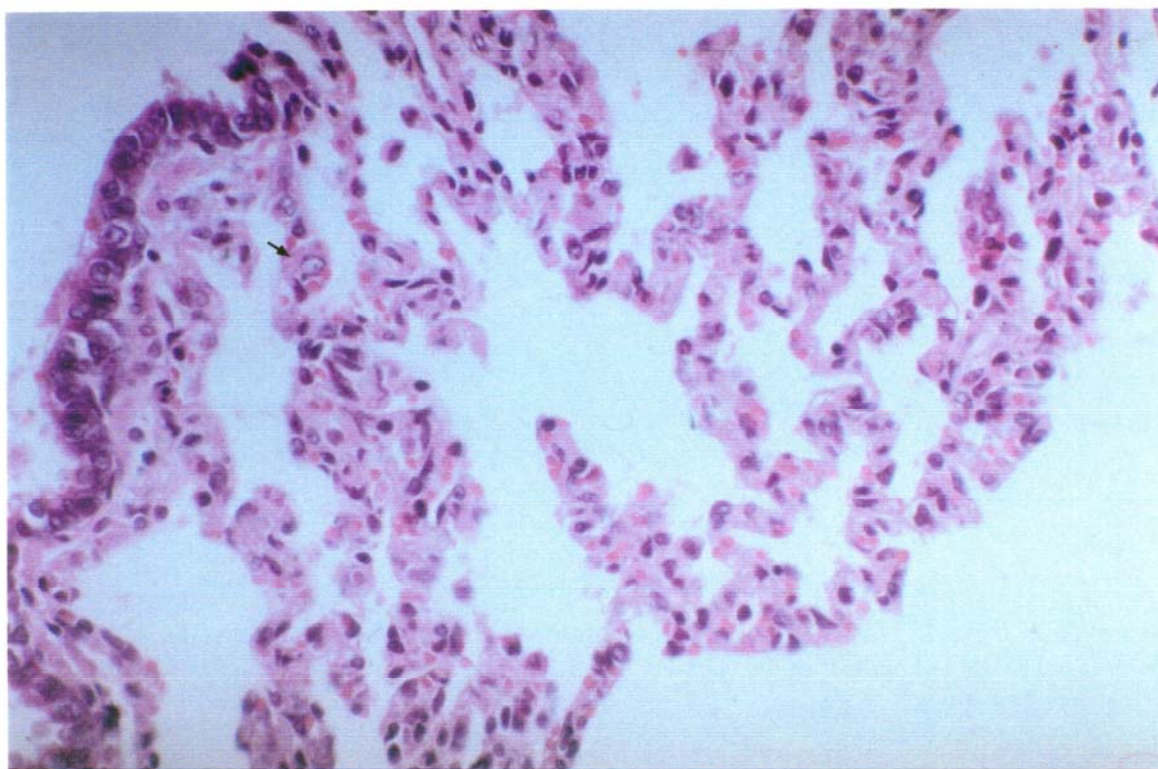




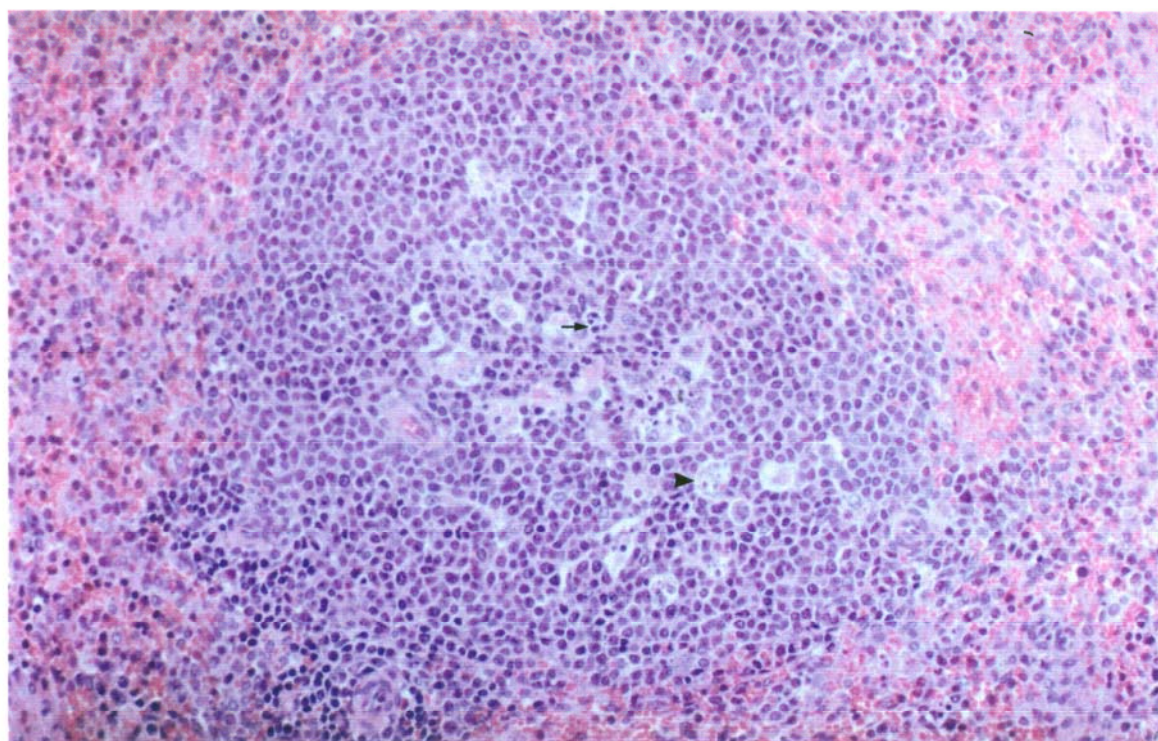
**Figura 1.-** 2 dpi. Bazo. Animal perfundido mostrando una estructura normal de la PER y de la PEB. H-E. x10.



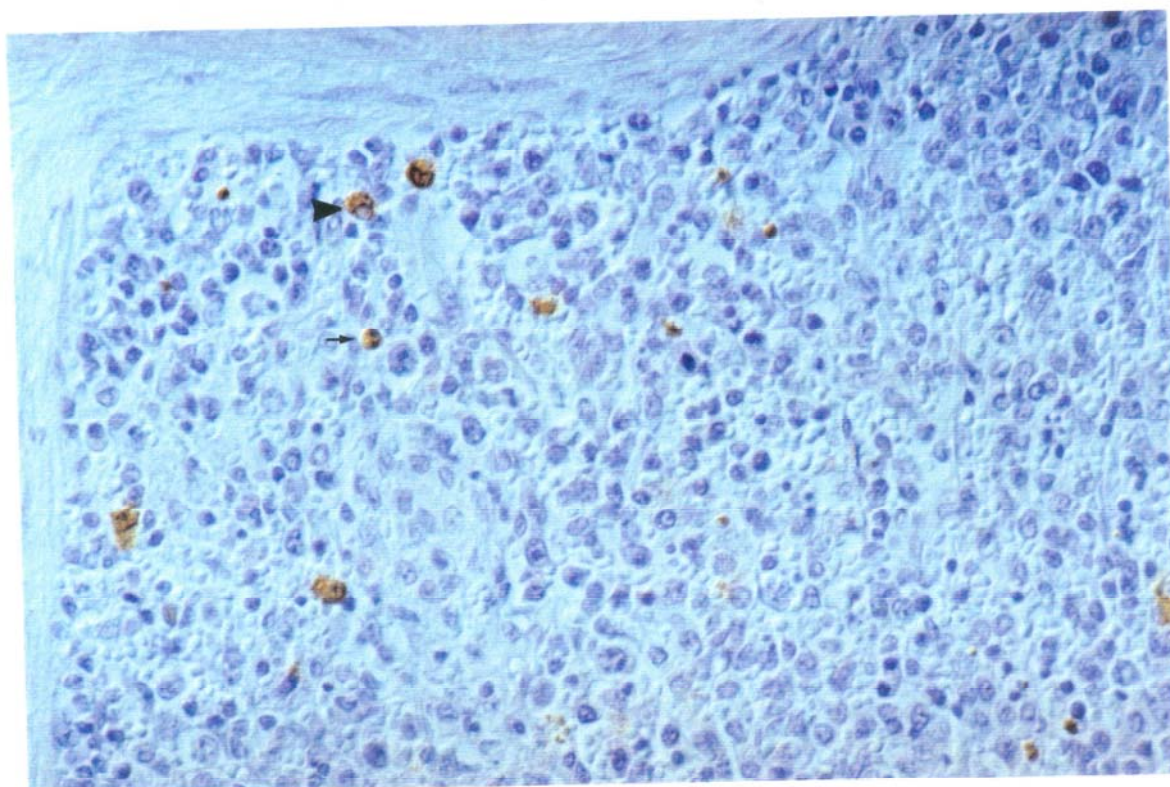
**Figura 2.-** 2 dpi. Tonsilas. Positividad en el epitelio de las criptas y en algunas células linfoplasmocitarias subepiteliales. ABC anti-IgM porcina. x20.



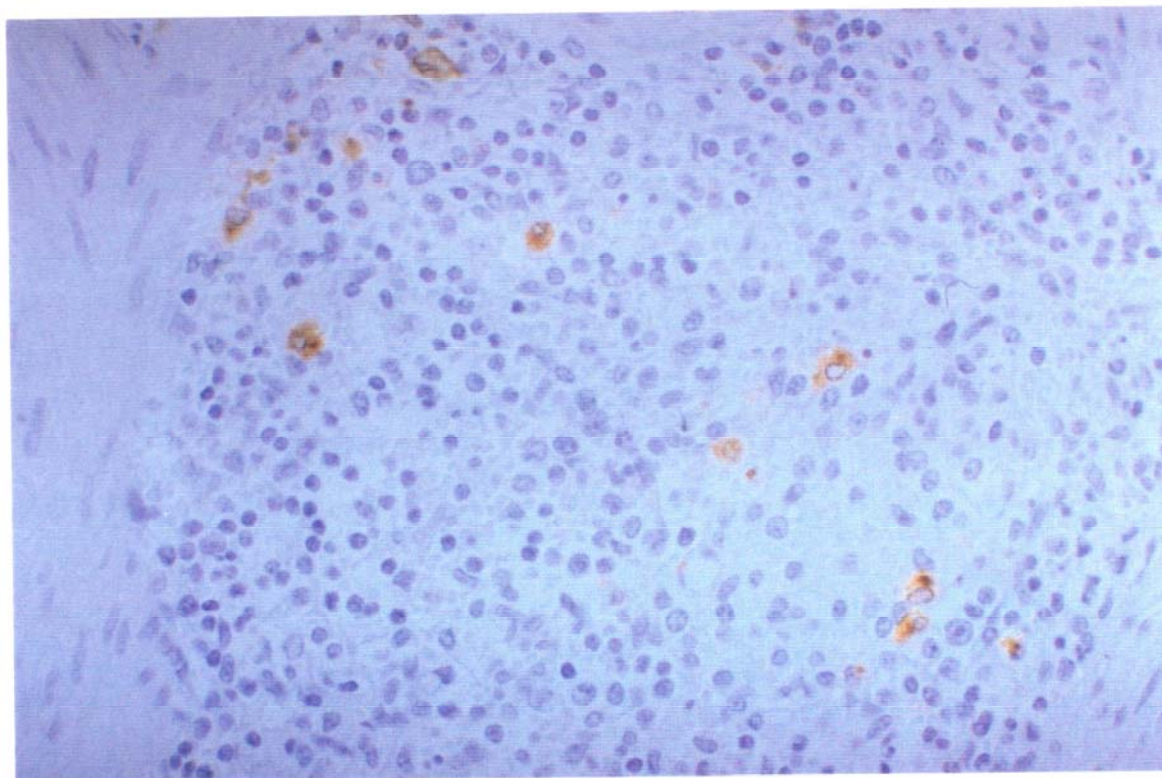
**Figura 3.-** 4 dpi. Pulmón. Aumento de células en los septos interalveolares con la presencia de restos celulares circulantes y macrófagos con marginación periférica de la cromatina (→). x40.



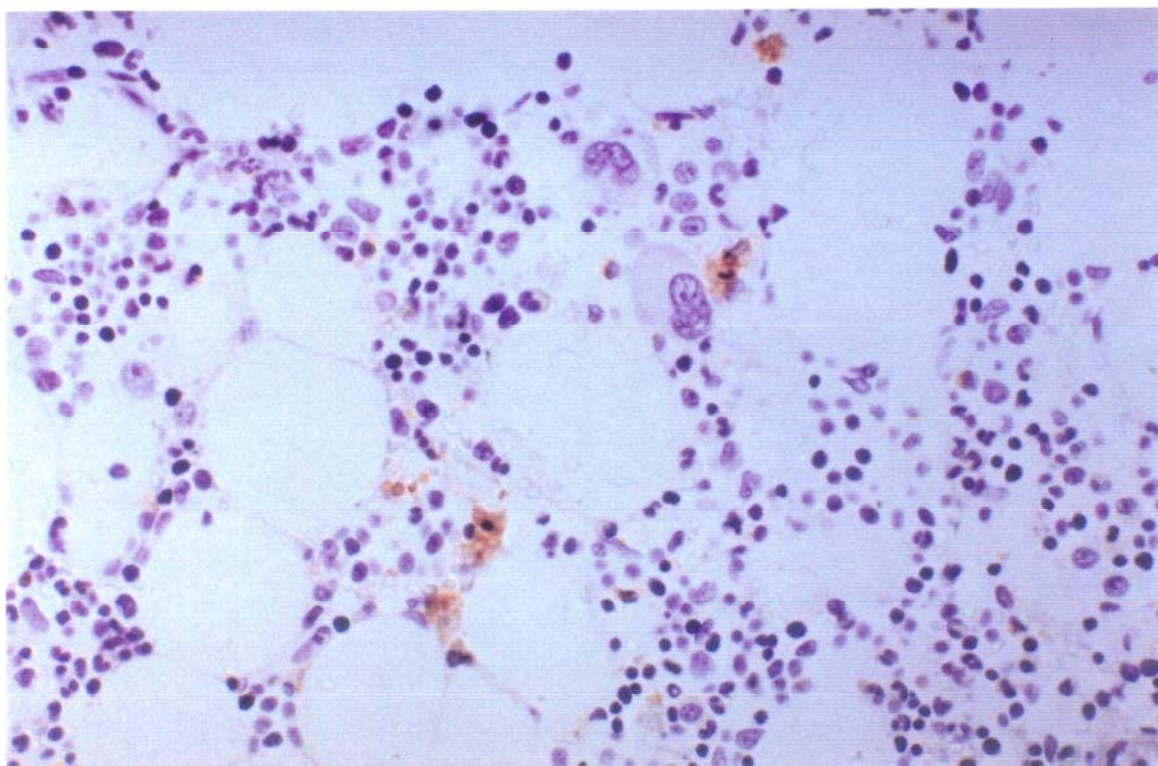
**Figura 4.-** 4 dpi. Bazo. Folículo linfoide mostrando necrosis aislada o en grupos de células reticulares (▶) y linfocitos (→). La pulpa esplénica roja presenta un aumento de células sanguíneas perifoliculares. H-E. x20.



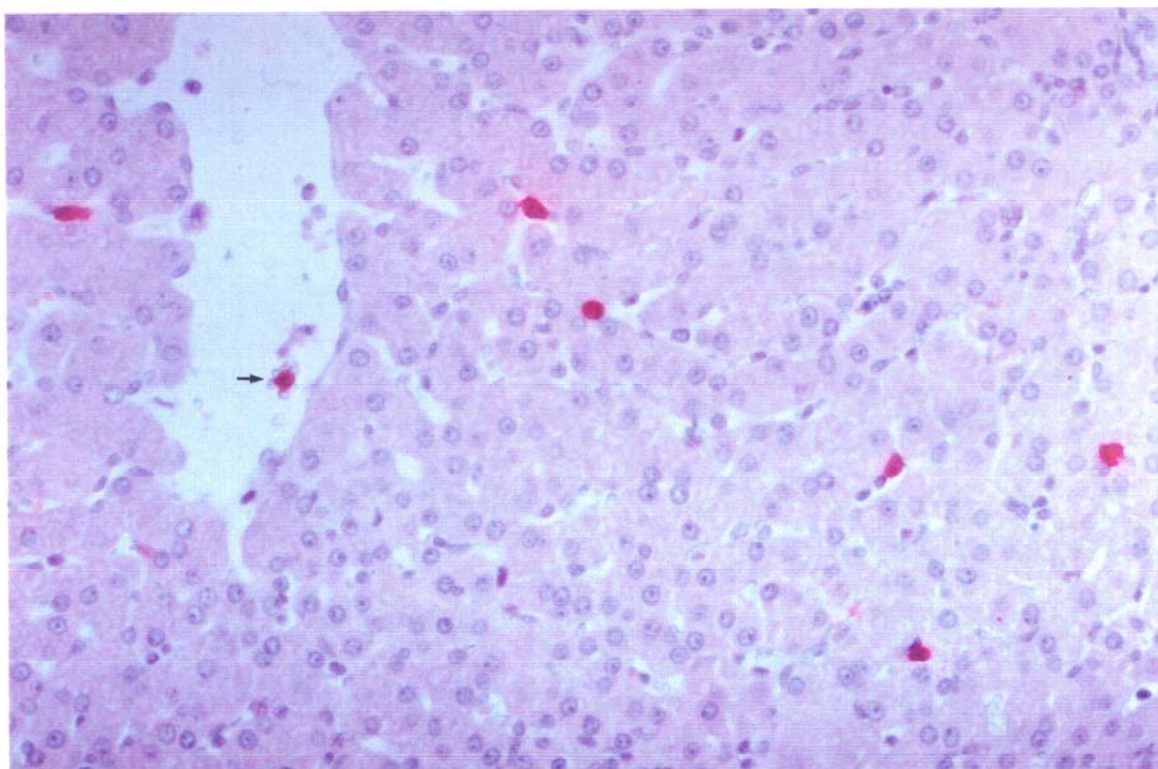
**Figura 5.-** 4 dpi. Bazo. Positividad difusa en macrófagos (▶) y neutrófilos (→) de la PER. ABC anti-PV73. x40. (Nomarsky).



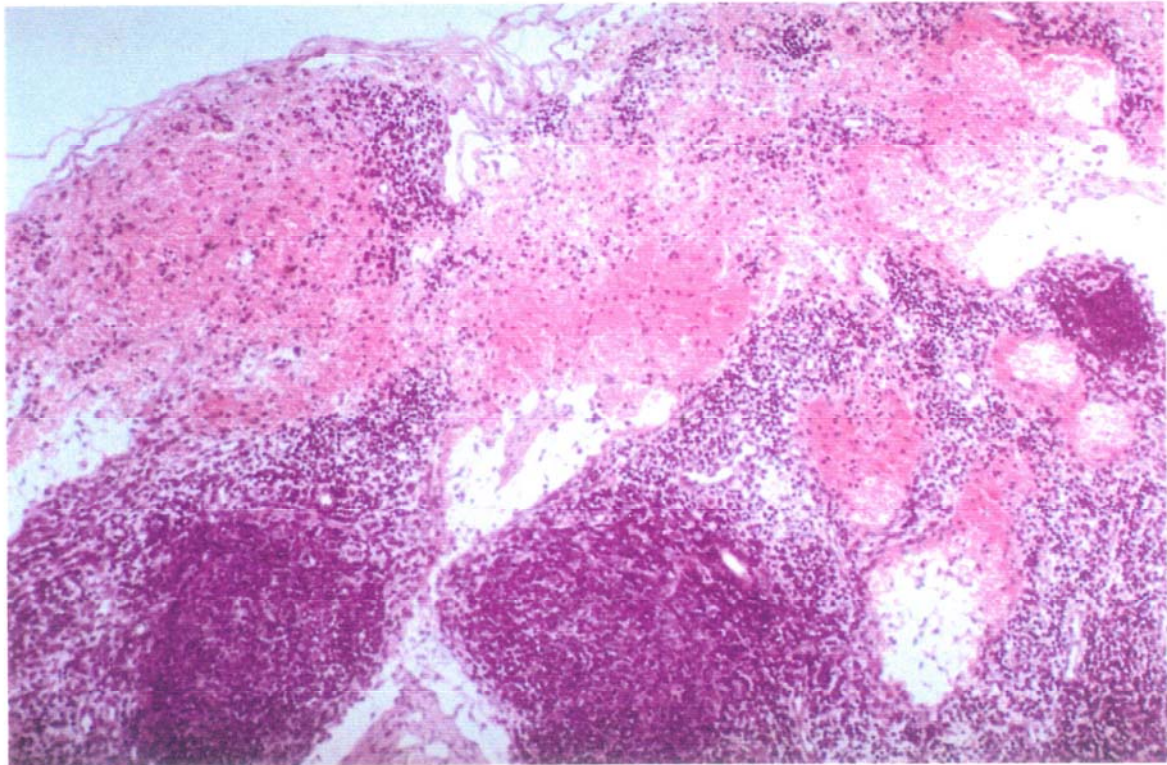
**Figura 6.-** 4 dpi. Bazo. Positividad difusa y en forma de cuerpo de inclusión en macrófagos de la PER. ABC anti-PV73. x40.



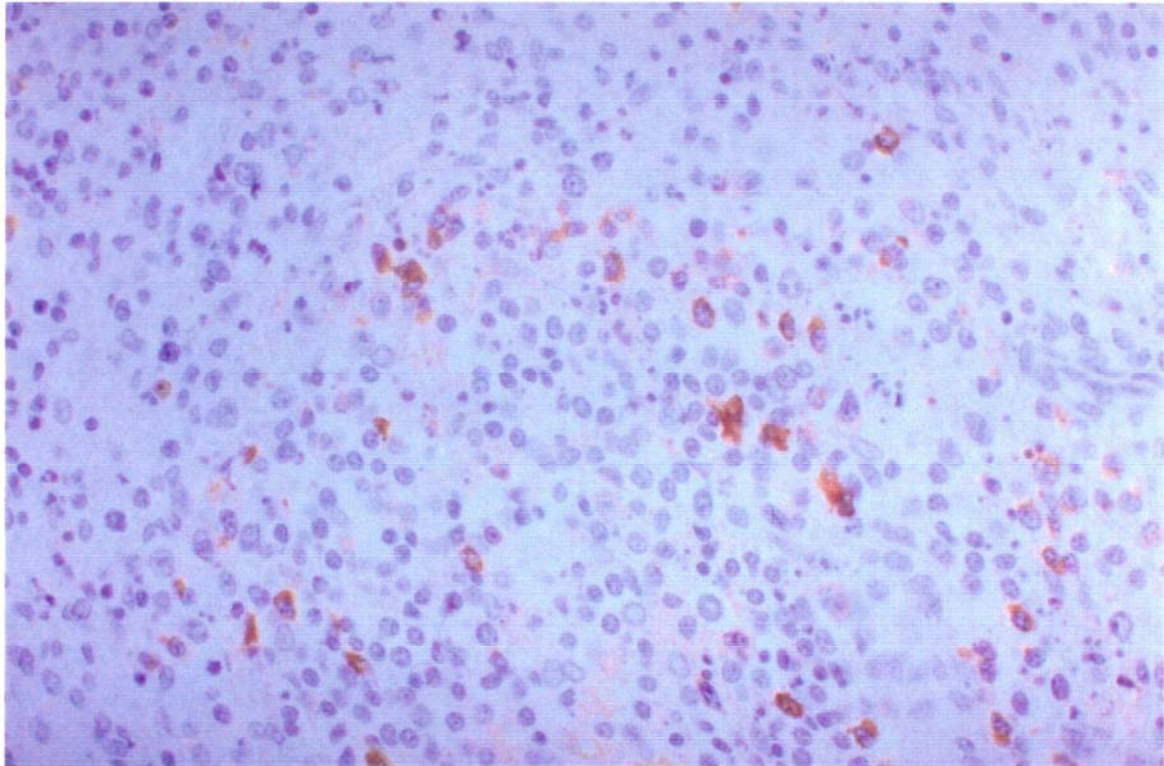
**Figura 7.-** 4 dpi. Médula Ósea. Positividad granular en macrófagos. Los megacariocitos presentan características morfológicas normales. ABC anti-PV73. x40.



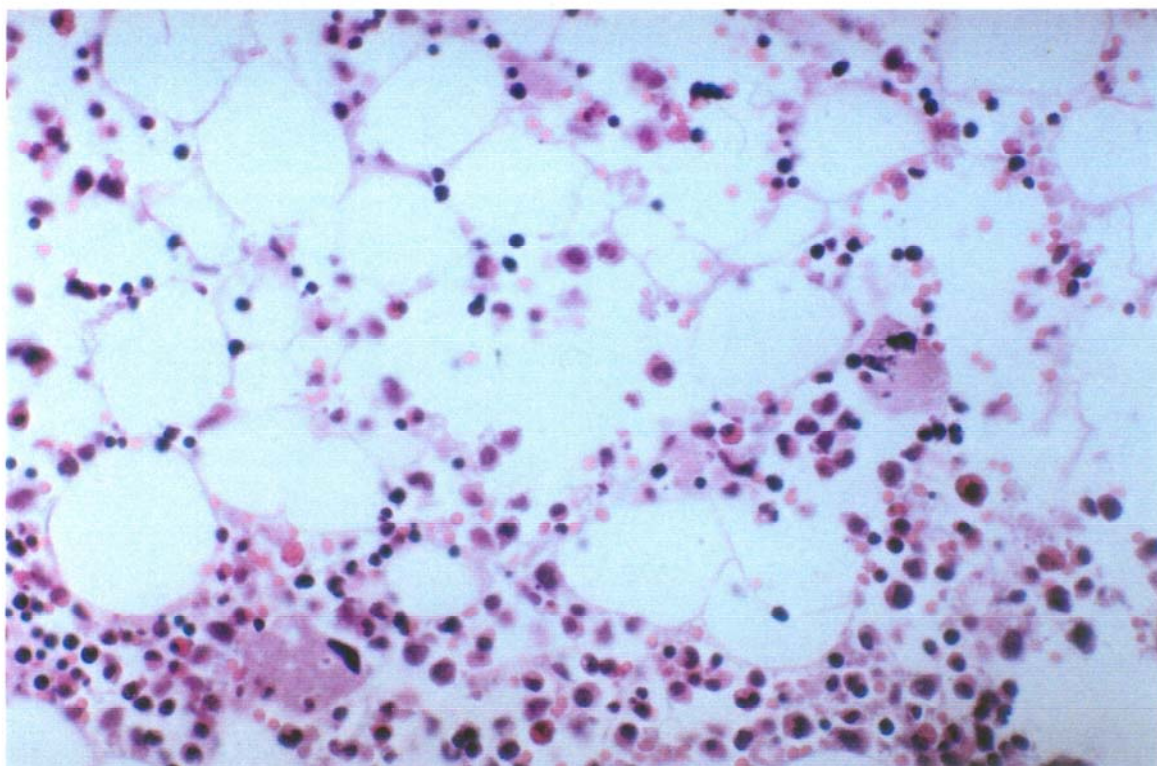
**Figura 8.-** 4 dpi. Hígado. Positividad difusa en células de Kupffer y en un monocito circulante con hemoadsorción (→). Strp FA anti-PV73. x20.



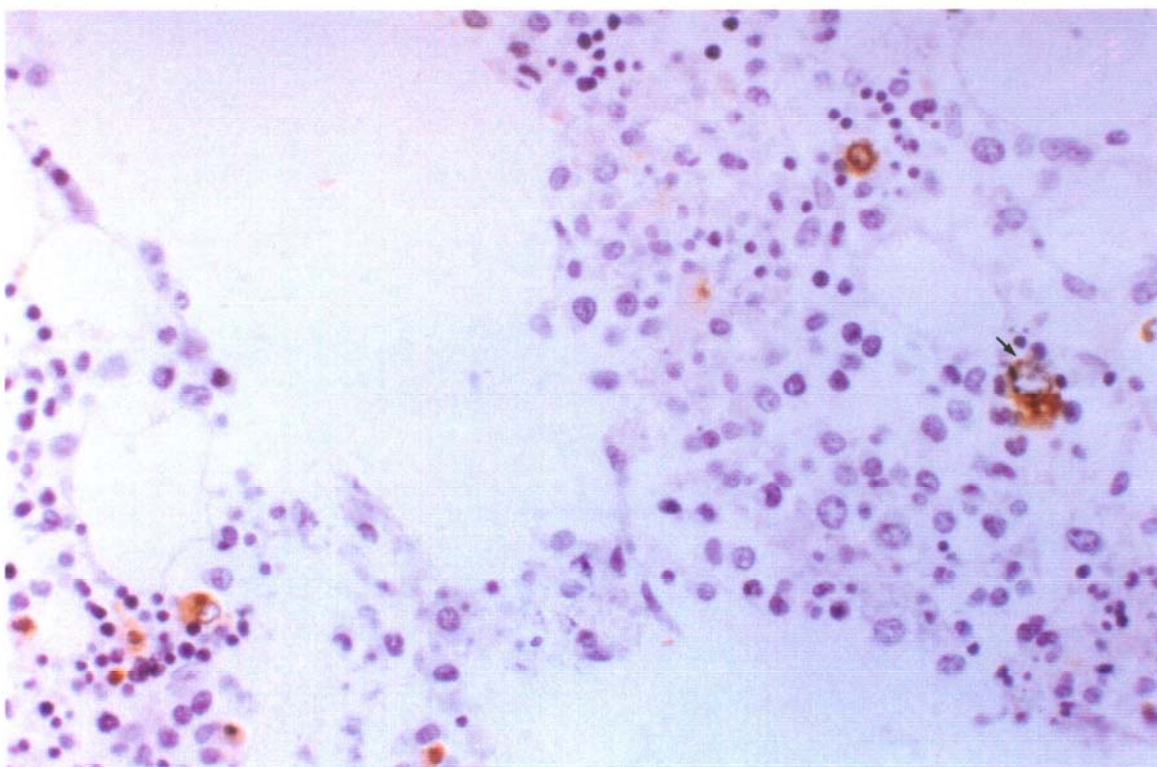
**Figura 9.-** 6 dpi. Ganglio gastrohepático. Hemorragias y necrosis de los senos linfáticos subcapsulares. H-E. x10.



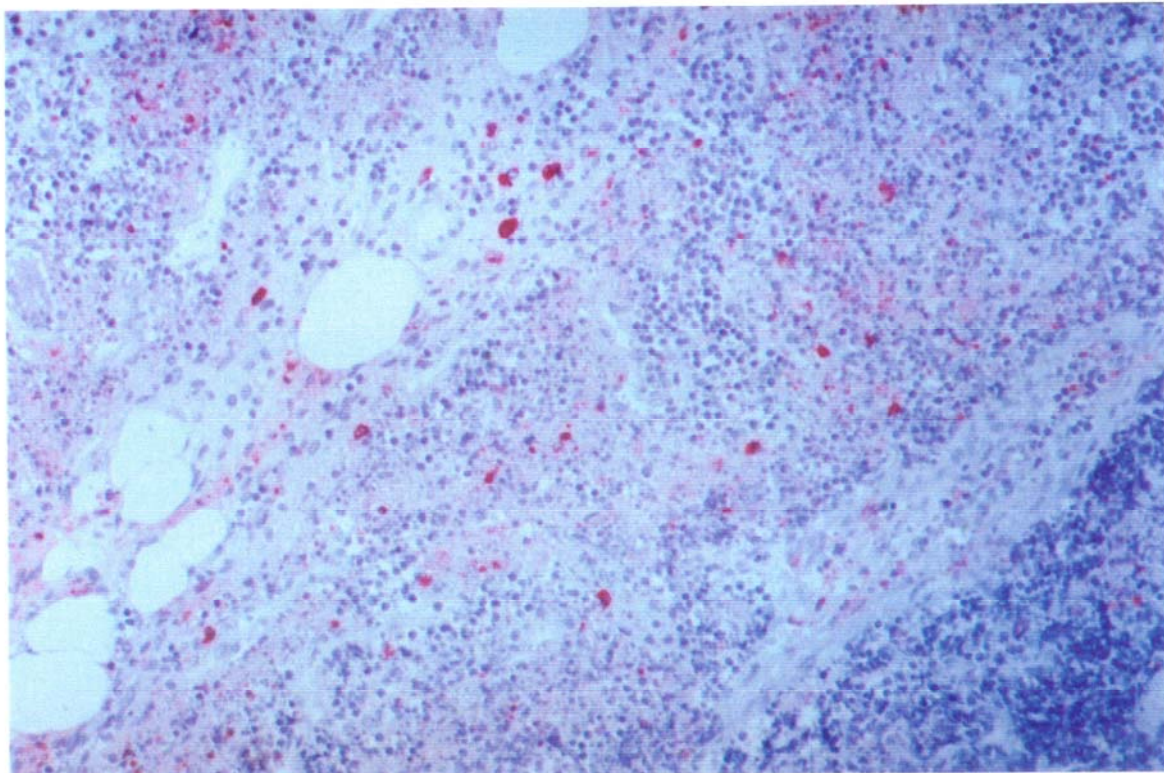
**Figura 10.-** 6 dpi. Ganglio linfático. Positividad citoplasmática difusa en células linfoplasmocitarias. ABC anti-IgA porcina. x20.



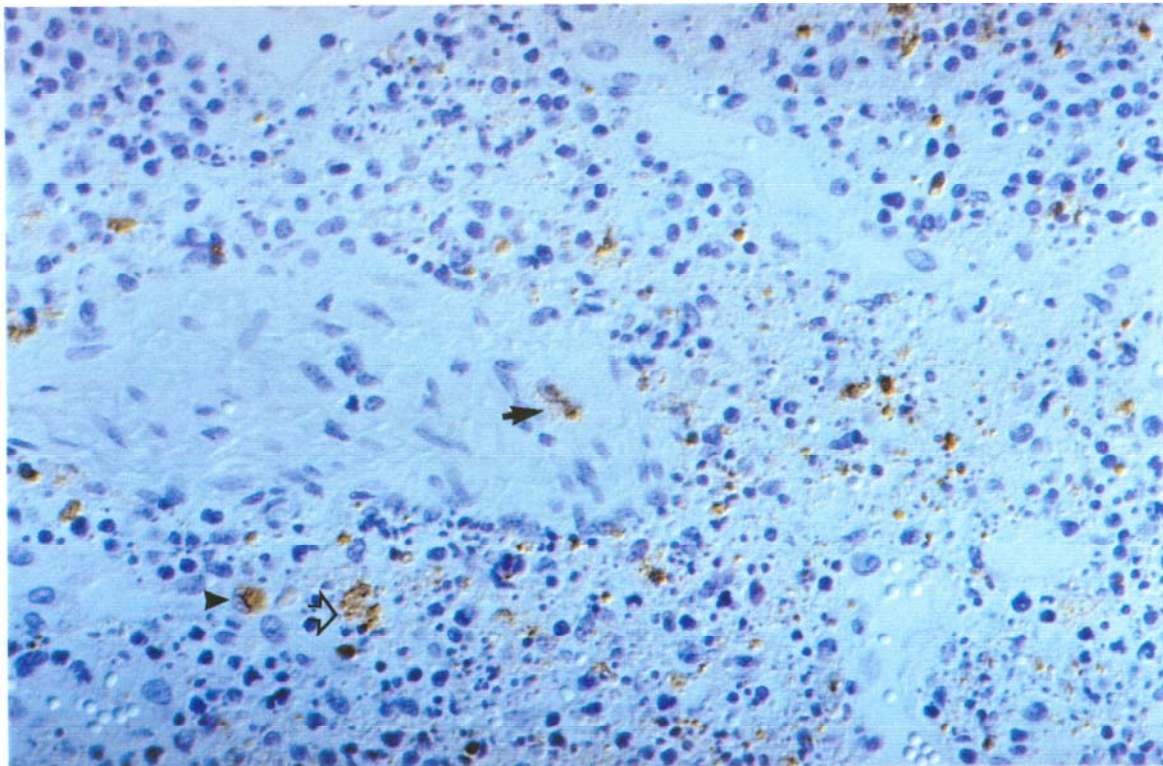
**Figura 11.-** 6 dpi. Médula Ósea. Megacariocitos mostrando picnosis y cariorrexis junto a abundantes mielocitos. H-E. x40.



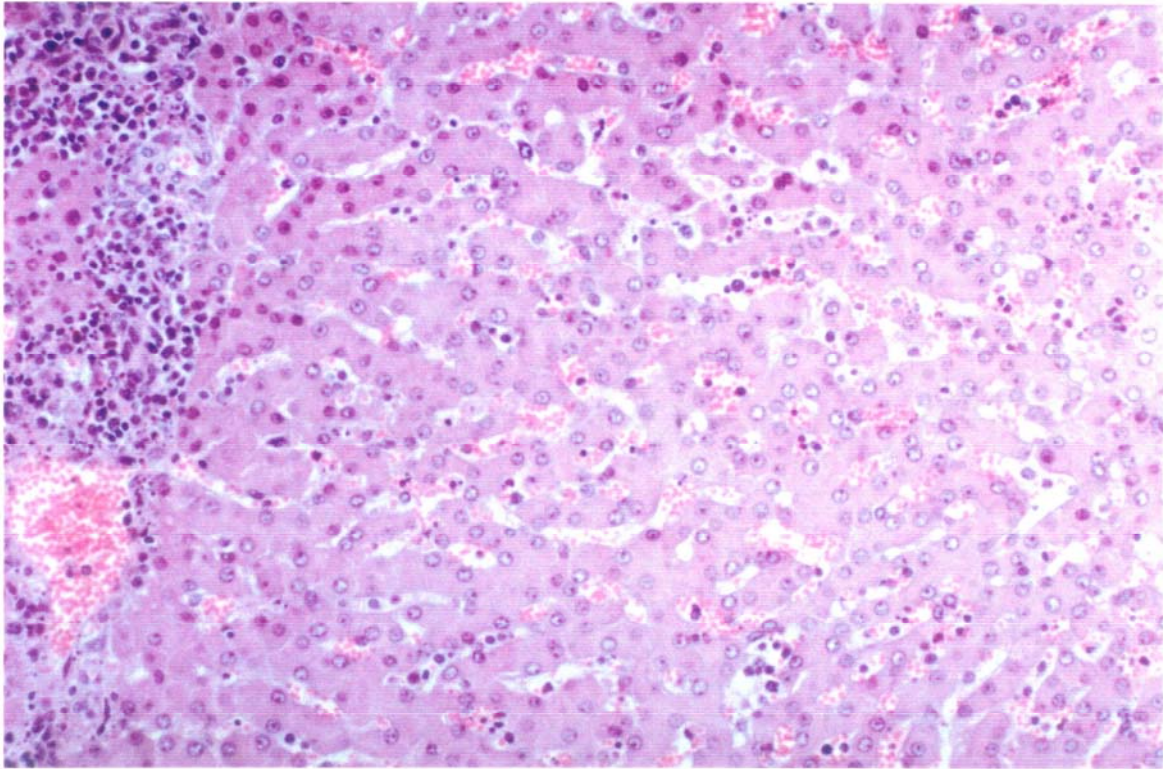
**Figura 12.-** 6 dpi. Médula Ósea. Positividad en monocito/ macrófagos, restos celulares y en un posible megacariocito (→). ABC anti-PV73. x20.



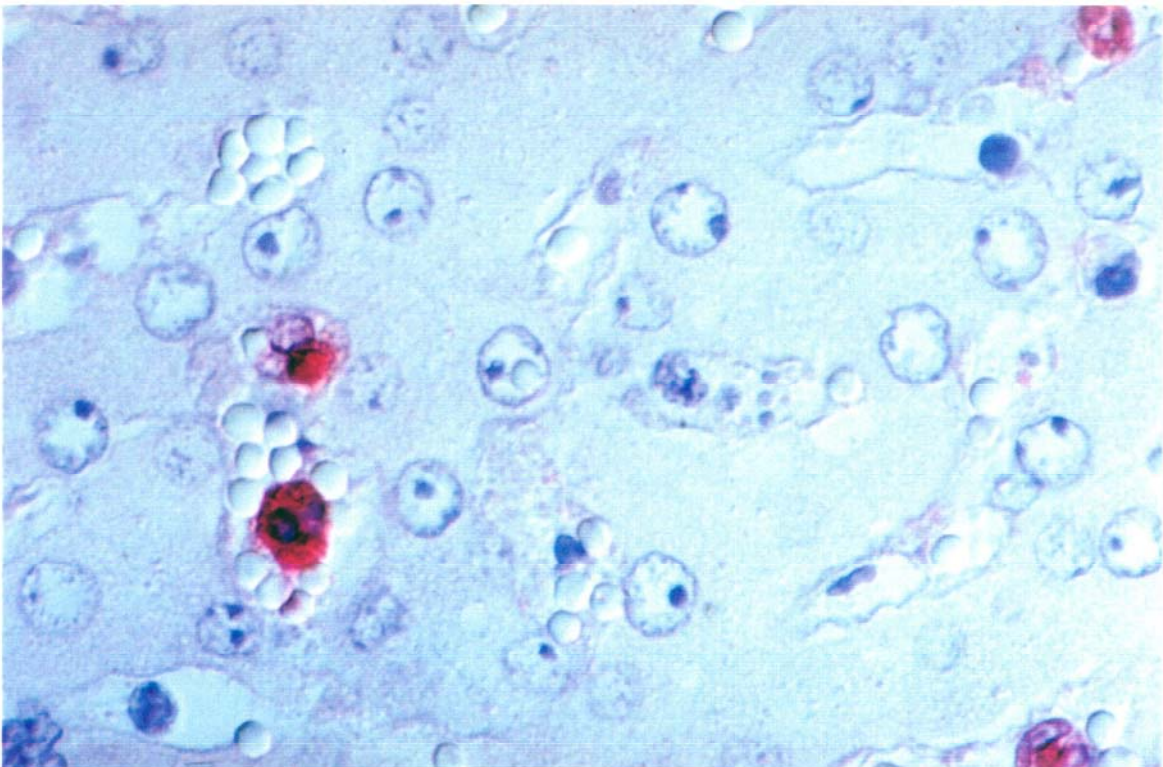
**Figura 13.-** 7 dpi. Ganglio linfático. Positividad en numerosas células y restos celulares en distintas áreas intensamente lesionadas. Strp FA anti-PV73. x20.



**Figura 14.-** 7 dpi. Ganglio linfático. Positividad en monocito/ macrófagos (▶) y en restos celulares (⇨) en los senos linfáticos y trabéculas (➔). ABC anti-PV73. x40. (Nomarsky).

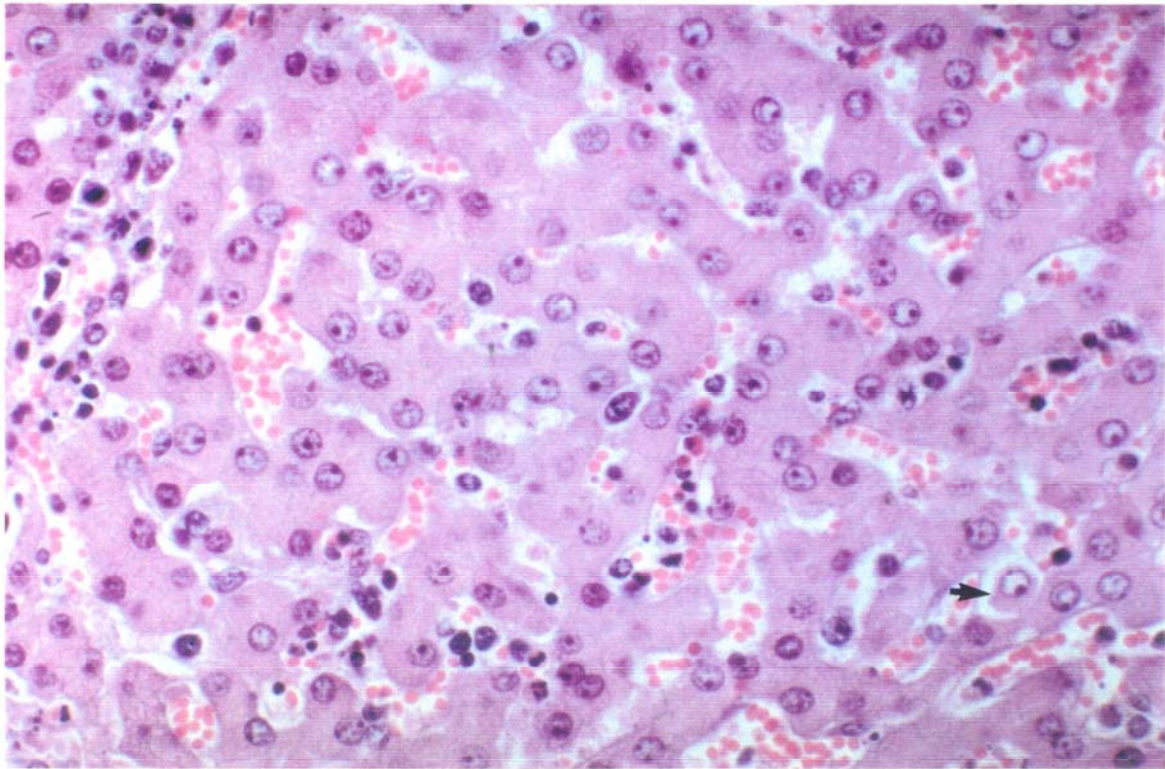


**Figura 15.-** 7 dpi. Hígado. Vasodilatación e infiltrado leucocitario intersticial con numerosas necrosis. Los sinusoides muestran numerosas células leucocitarias en necrosis. H-E. x20.

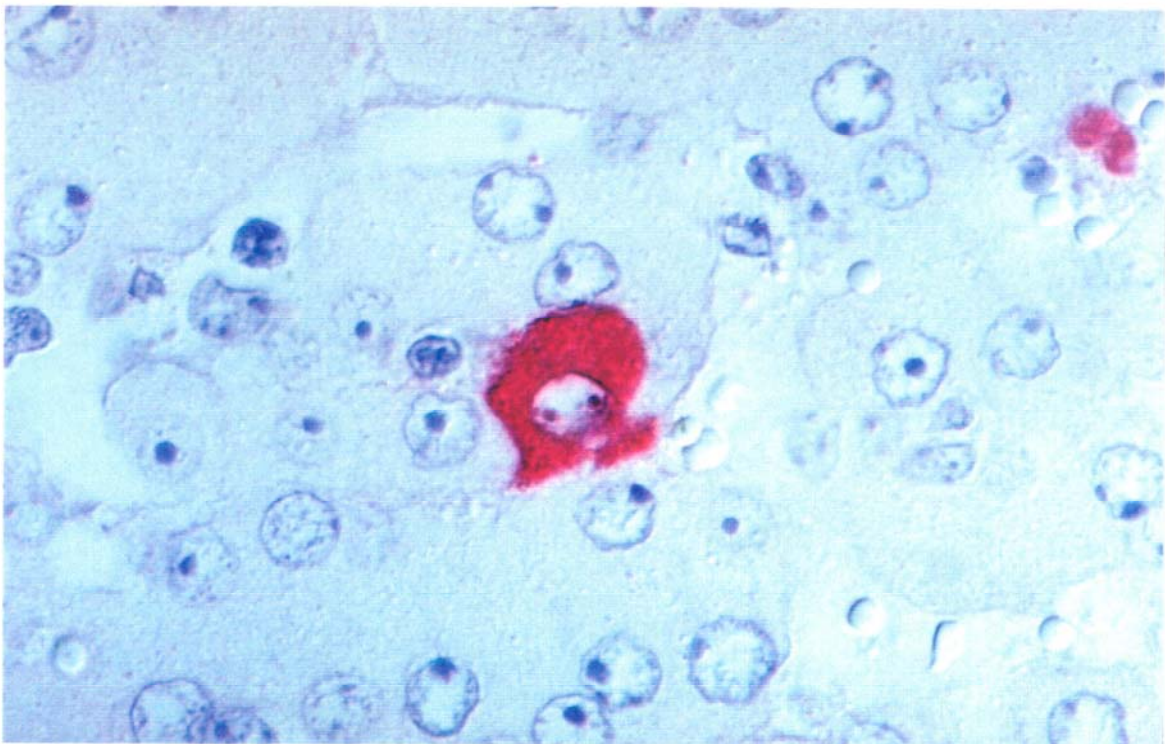


**Figura 16.-** 7 dpi. Hígado. Positividad difusa en un monocito circulante mostrando hemoadsorción y, en forma de cuerpo de inclusión en células de Kupffer con marginación periférica de la cromatina. Strp FA anti-PV73. x100. (Nomarsky).

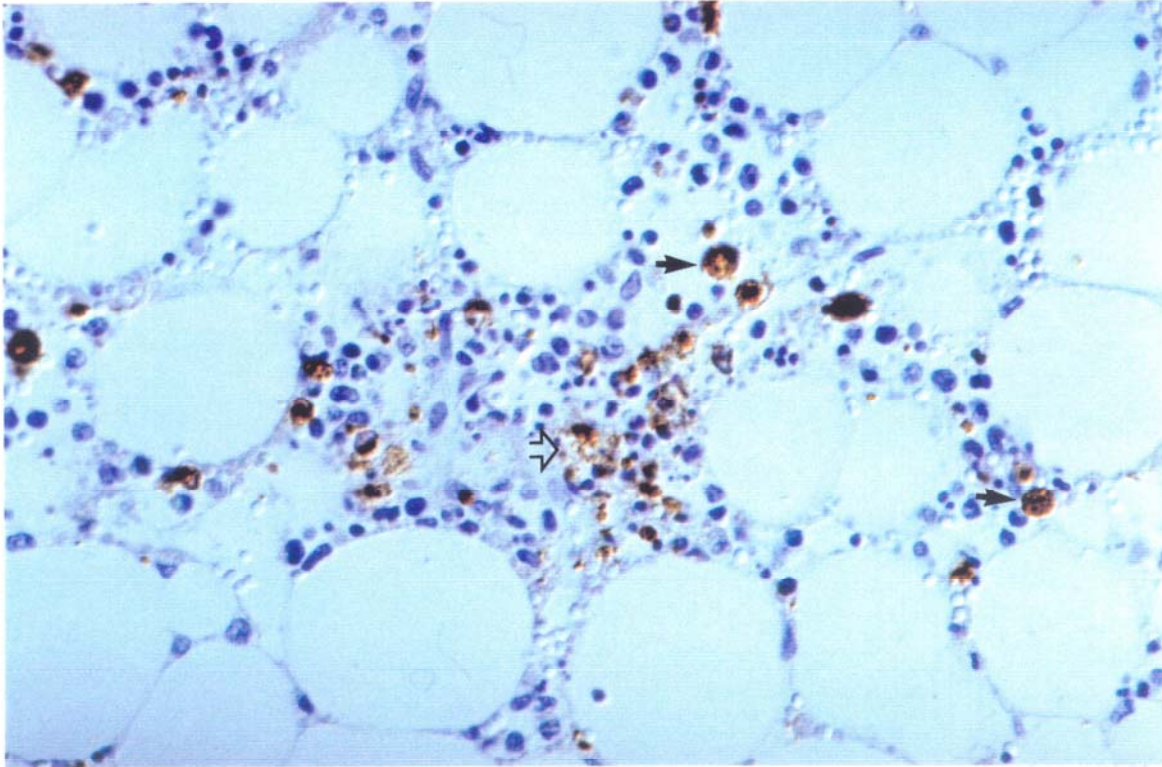




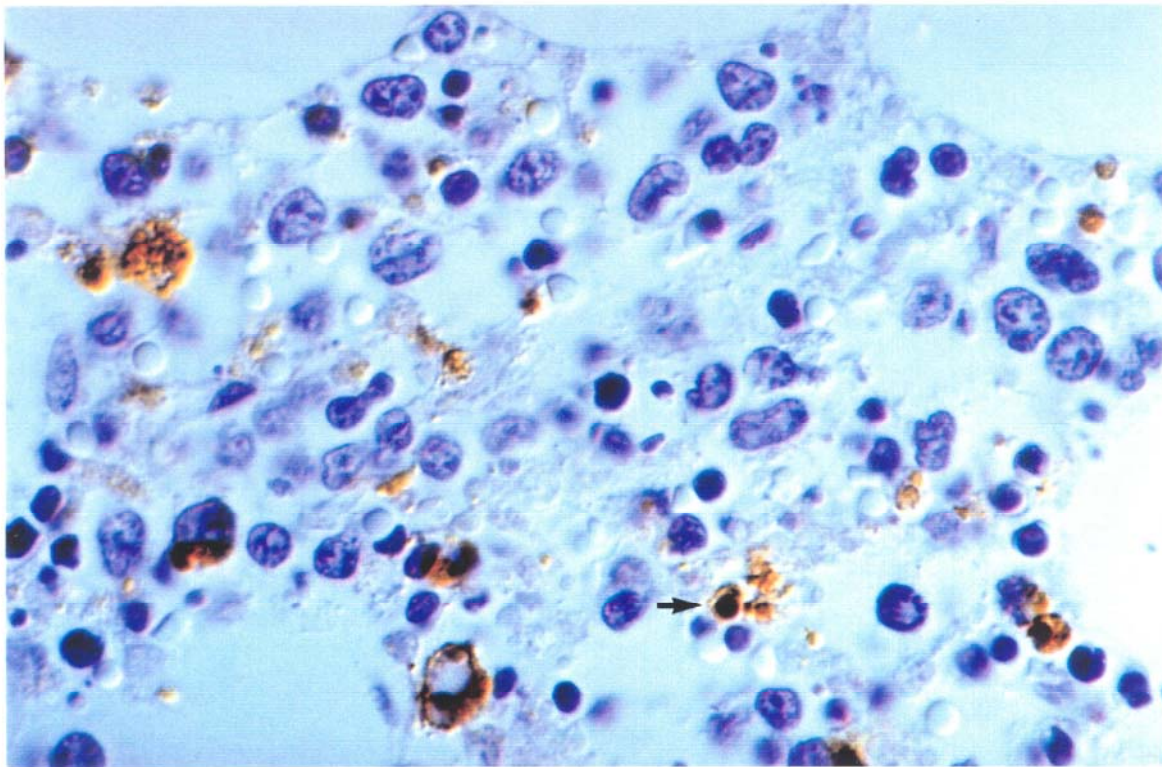
**Figura 17.-** 7 dpi. Hígado. Numerosos leucocitos en los sinusoides mostrando muchos de ellos necrosis. Hepatocito con redondeamiento del citoplasma y marginación de la cromatina (→). H-E. x40.



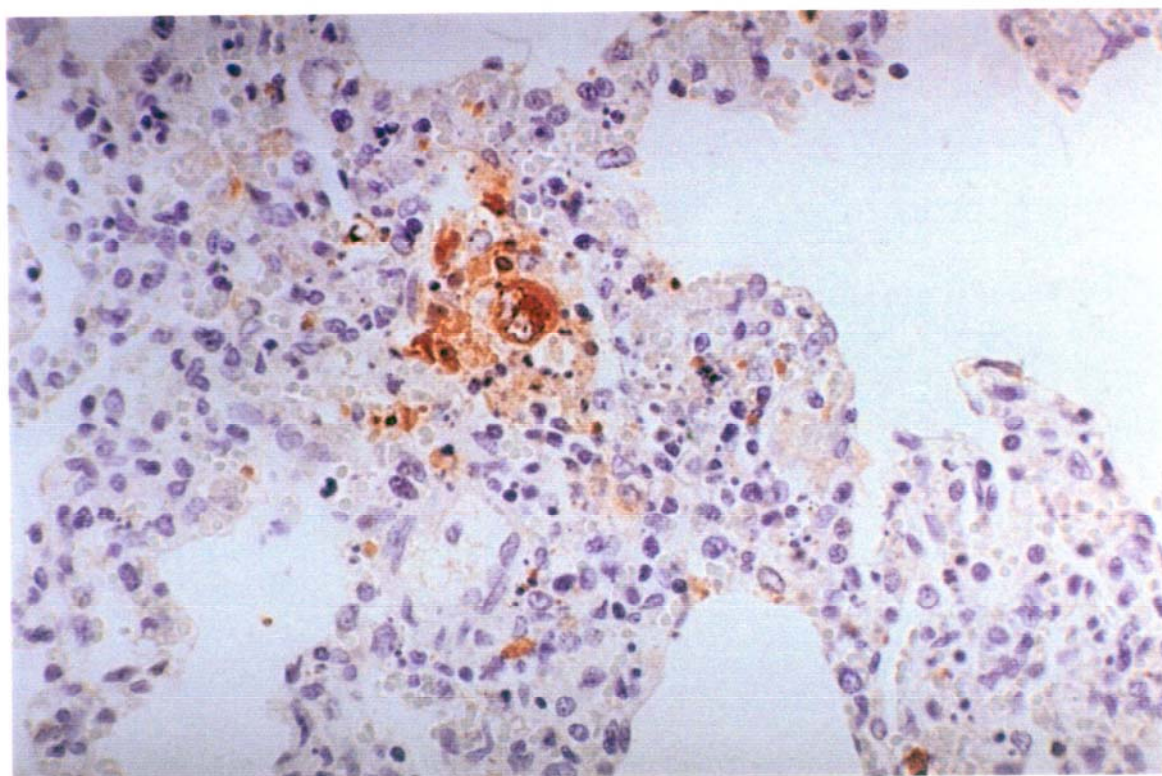
**Figura 18.-** 7 dpi. Hígado. Positividad difusa en un hepatocito. Strp FA anti-PV73. x100. (Nomarsky).



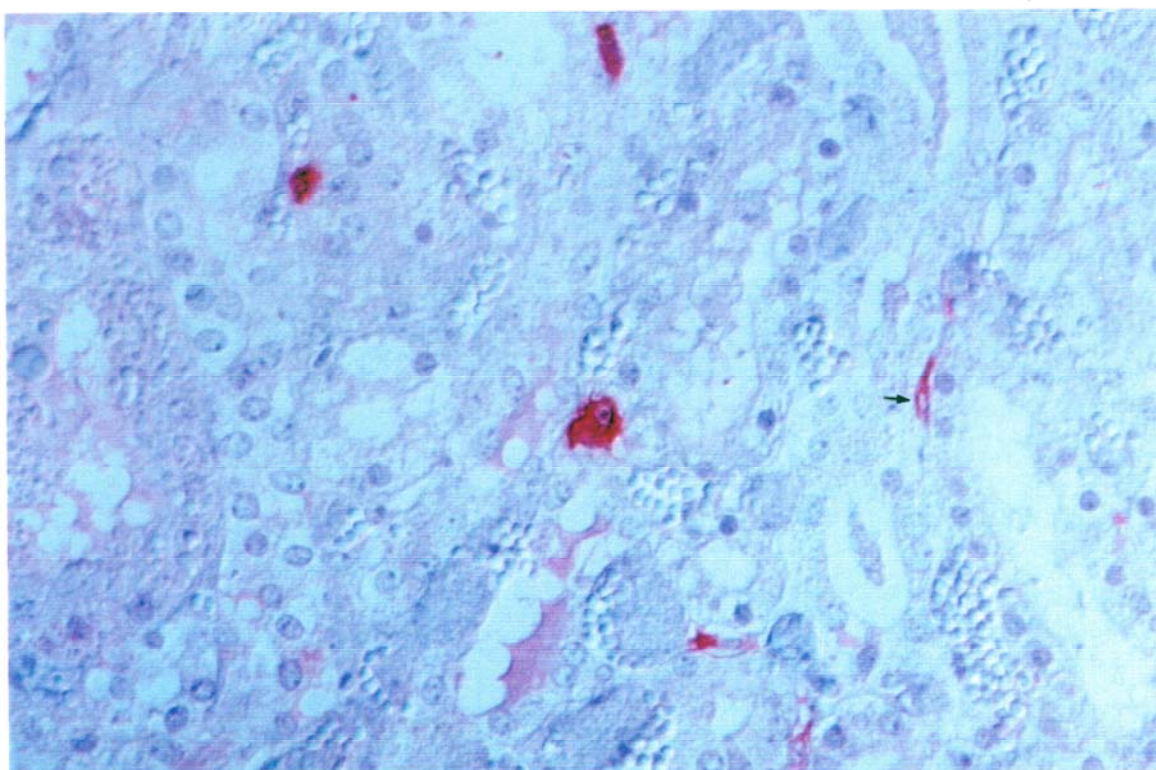
**Figura 19.-** 7 dpi. Médula Ósea. Positividad granular en monocito/ macrófagos (→) y en restos celulares (⇨). ABC anti-PV73. x40. (Nomarsky).



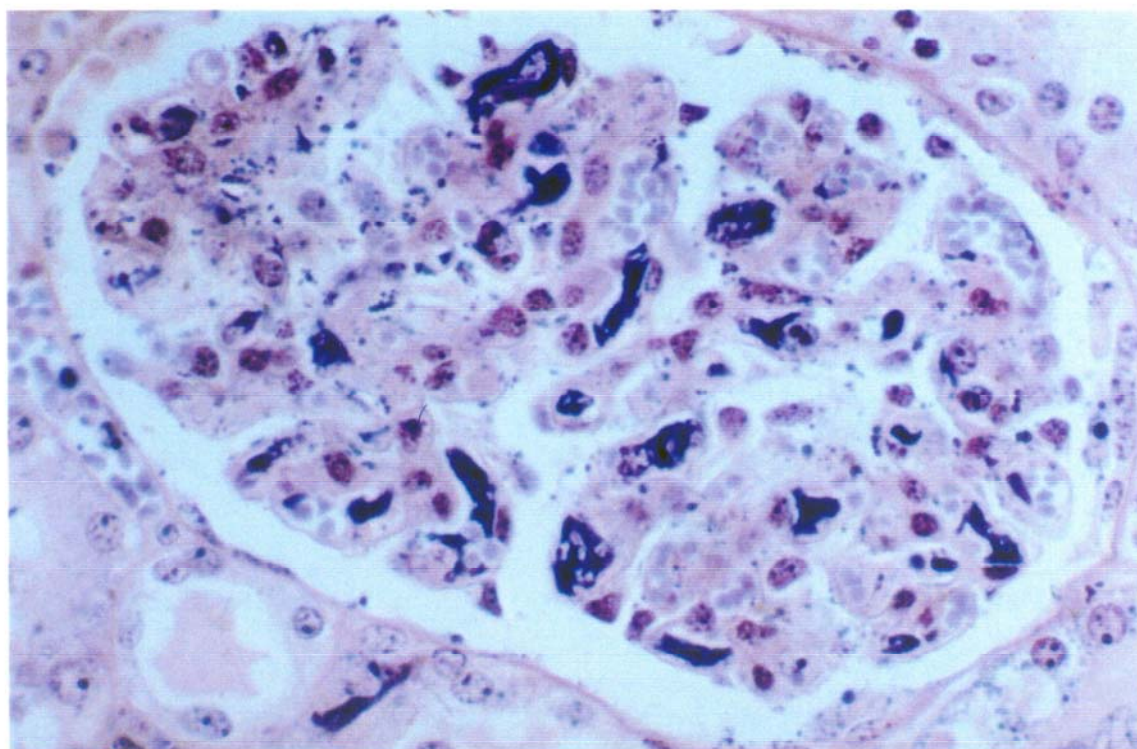
**Figura 20.-** 7 dpi. Médula Ósea. Positividad granular en monocito/ macrófagos y en células inmaduras (→). ABC anti-PV73. x 100. (Nomarsky).



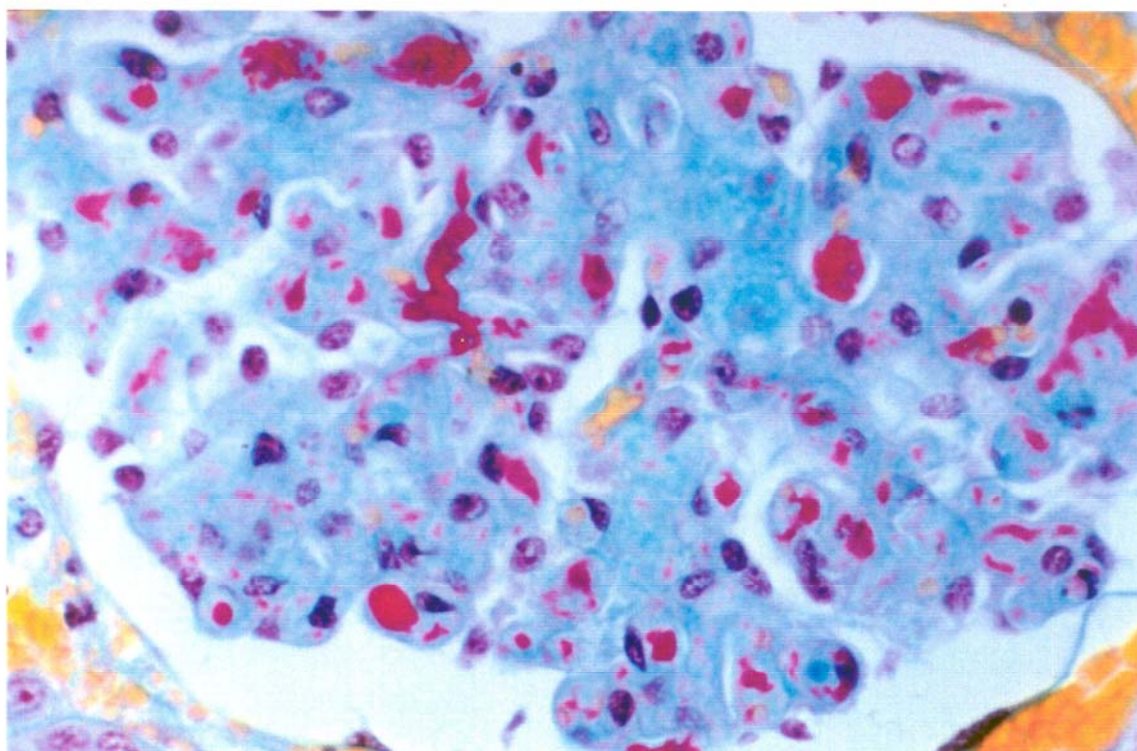
**Figura 21.-** 7 dpi. Pulmón. Positividad difusa en un megacariocito, células mononucleares y restos celulares intravasculares. ABC anti-PV-73. x40.



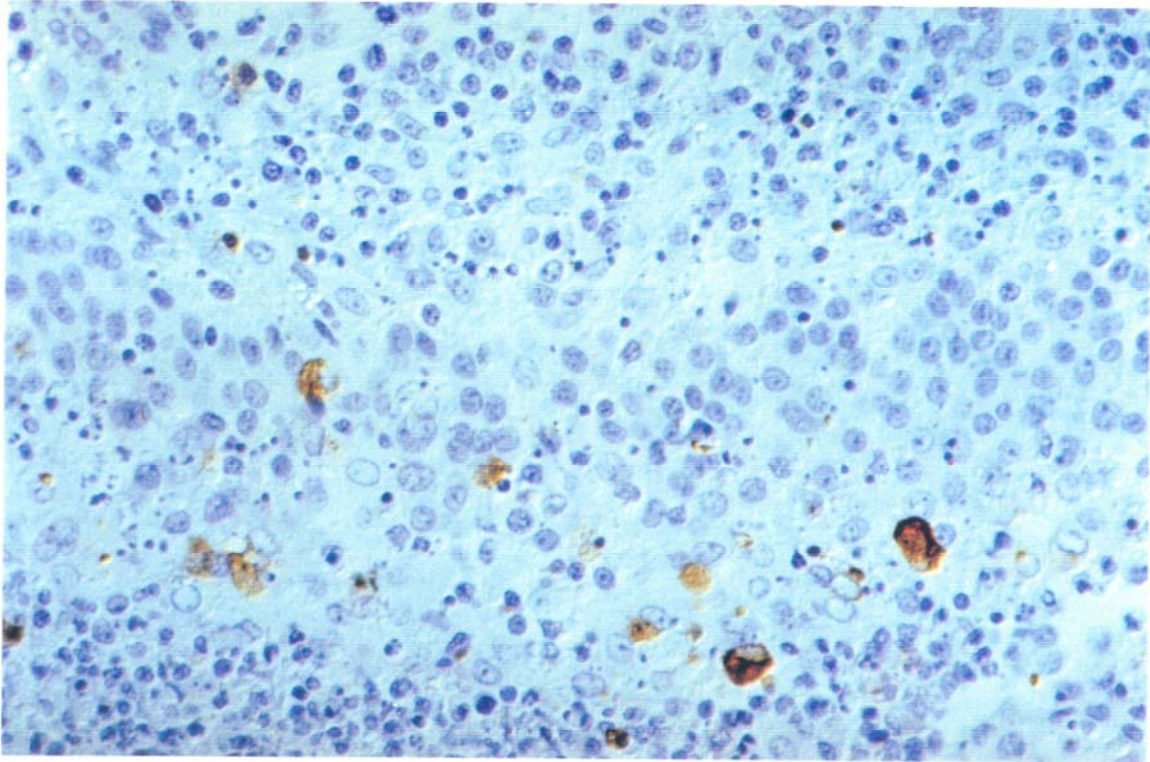
**Figura 22.-** 7 dpi. Riñón. Positividad difusa en monocito/ macrófagos intertubulares y en una célula probablemente endotelial (→). Strp FA anti-PV73. x40. (Nomarsky).



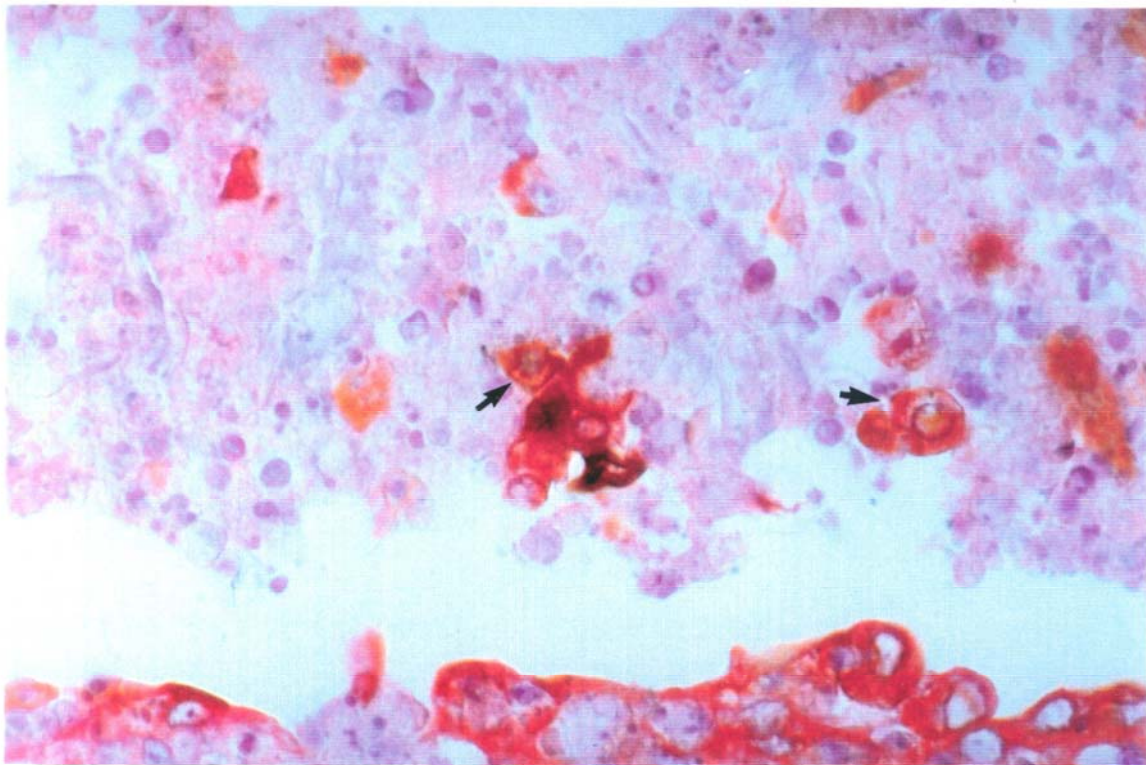
**Figura 23.-** 7 dpi. Riñón. Demostración histoquímica de fibrina presente en los microtrombos de los capilares glomerulares. PTAH. x40.



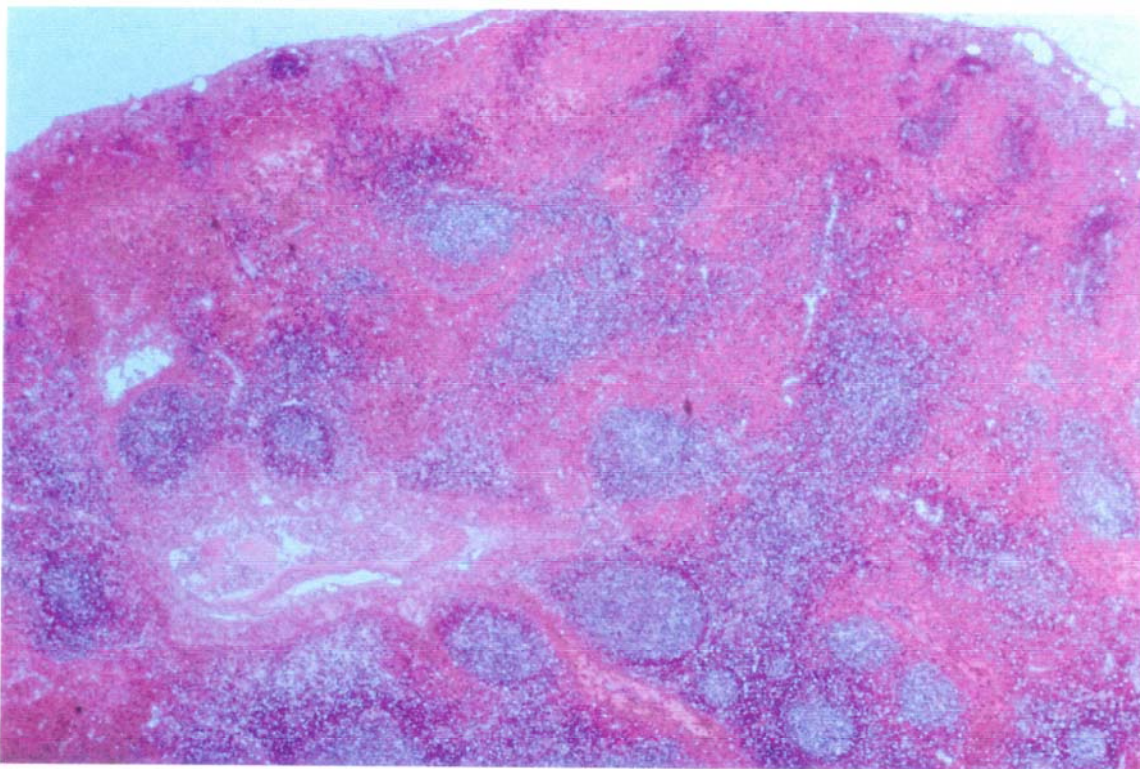
**Figura 24.-** 7 dpi. Riñón. Demostración histoquímica de fibrina presente en los microtrombos de los capilares glomerulares. Frasser-Lemdrum. x40.



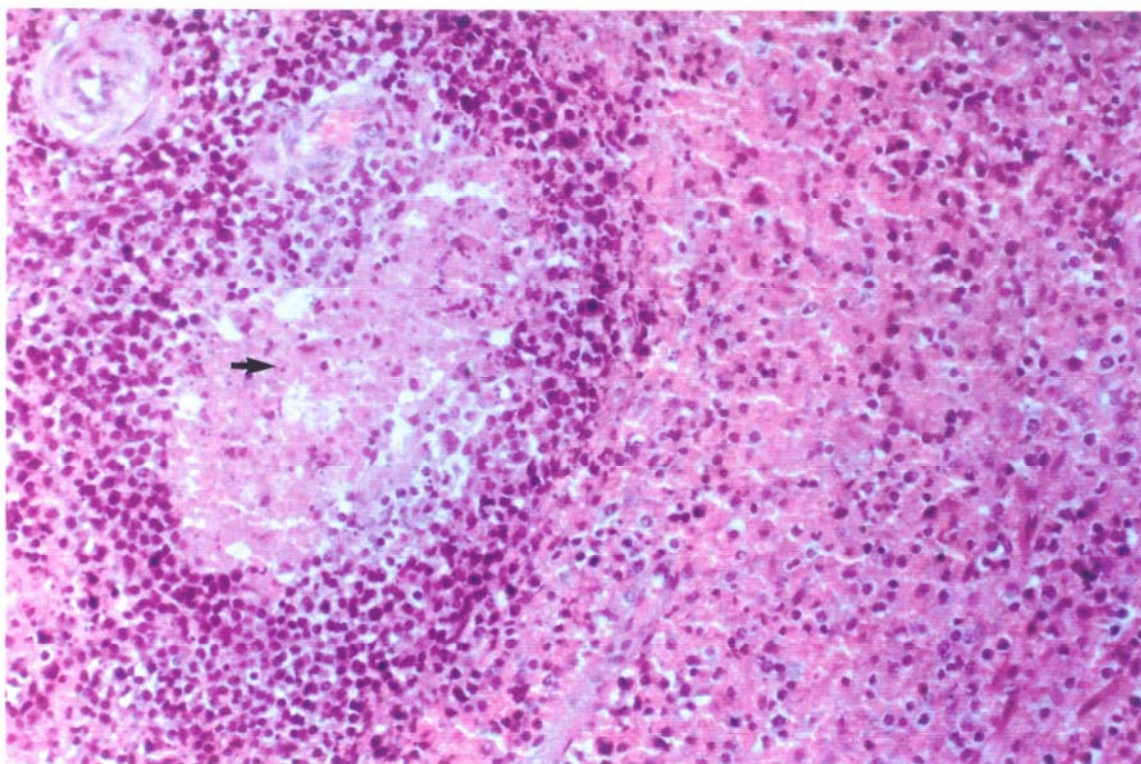
**Figura 25.-** 7 dpi. Tonsilas. Positividad difusa y en forma de cuerpo de inclusión en células intraepiteliales de las criptas. ABC anti-PV73. x40. (Nomarsky).



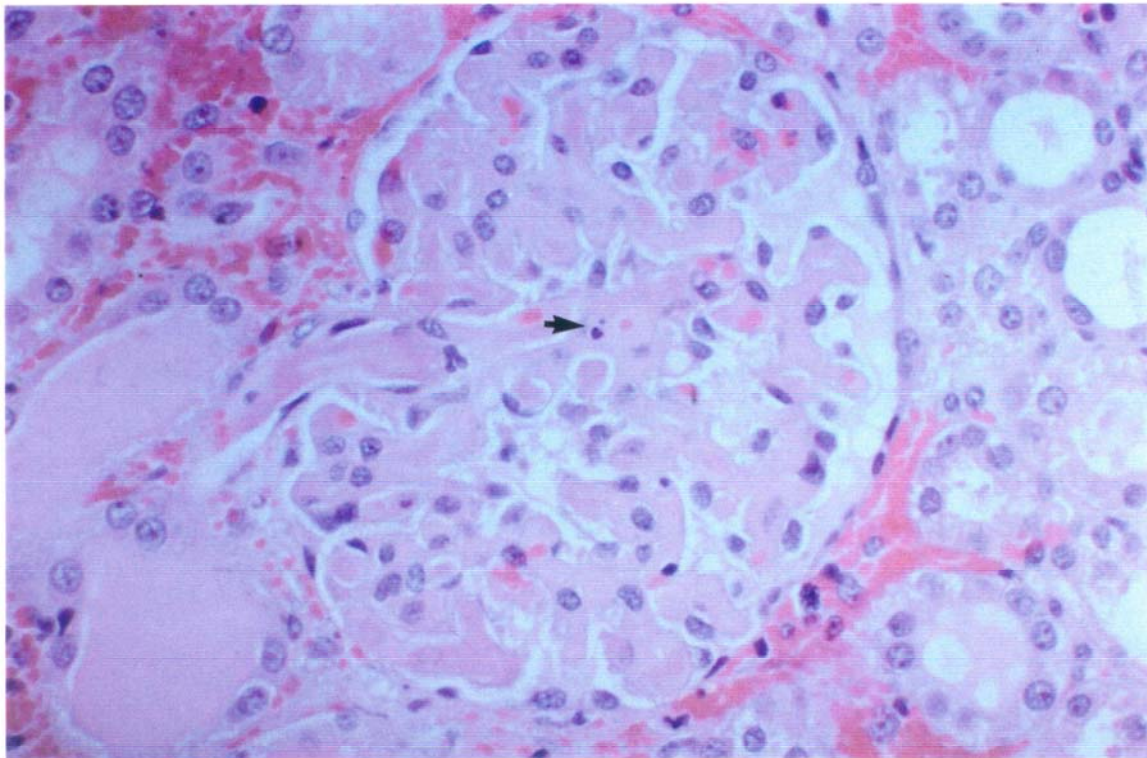
**Figura 26.-** 7 dpi. Tonsilas. Células descamadas mostrando positividad citoplasmática PV73 y citoqueratina (→). ABC anti-citoqueratina y Strp FA anti-PV73. x40.



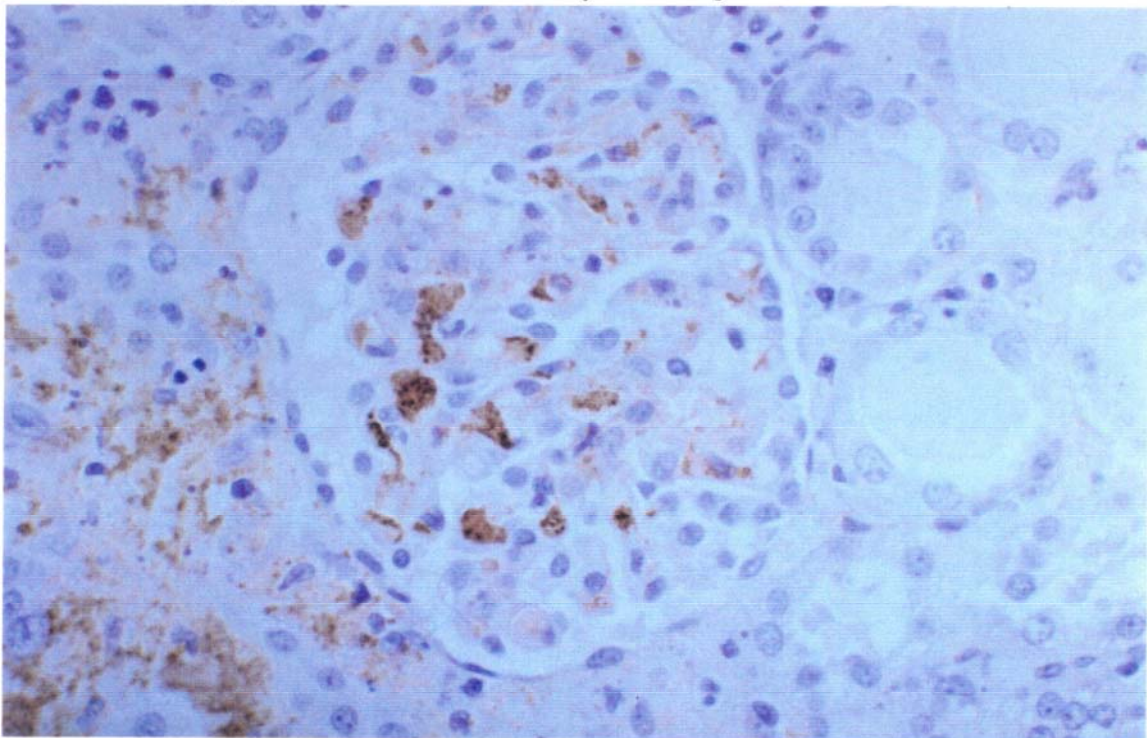
**Figura 27.-** 10 dpi. Ganglio gastrohepático. Hemorragias en senos subcapsulares y trabeculares junto a una marcada disminución de linfocitos en los folículos linfoides. H-E. x4.



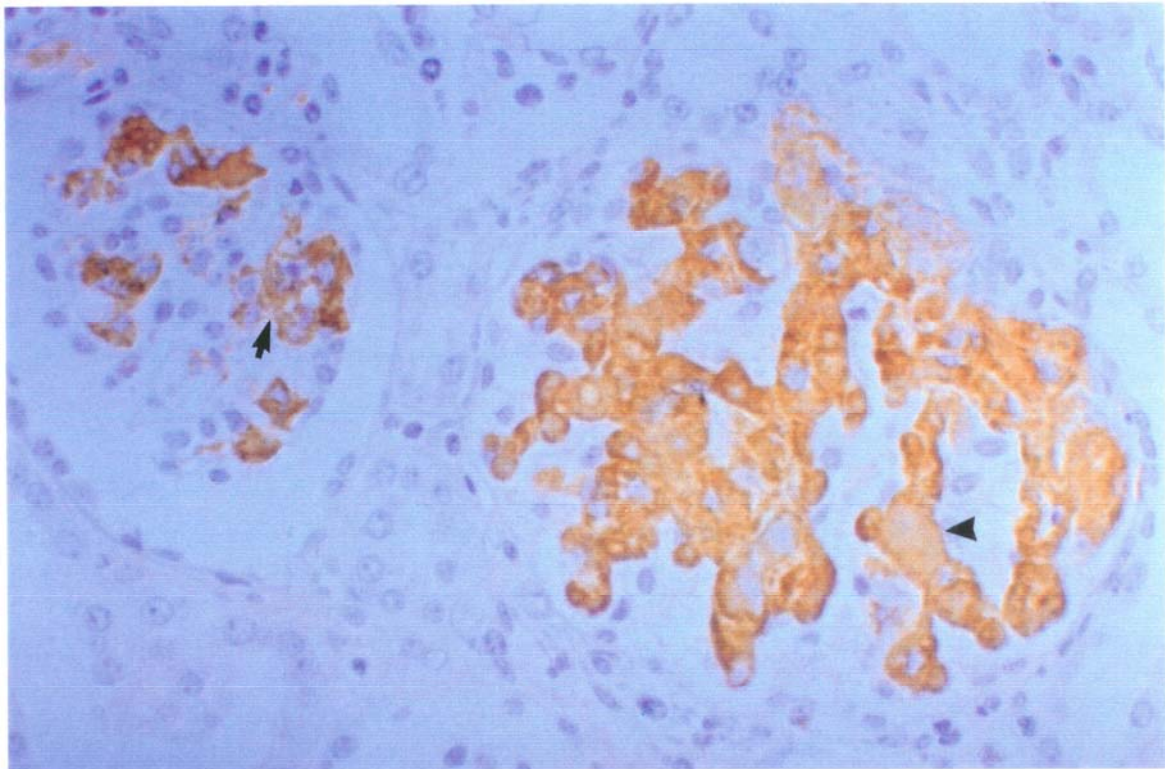
**Figura 28.-** 10 dpi. Bazo. Intensa necrosis en folículo linfoide (➔) y en pulpa roja. H-E. x20.



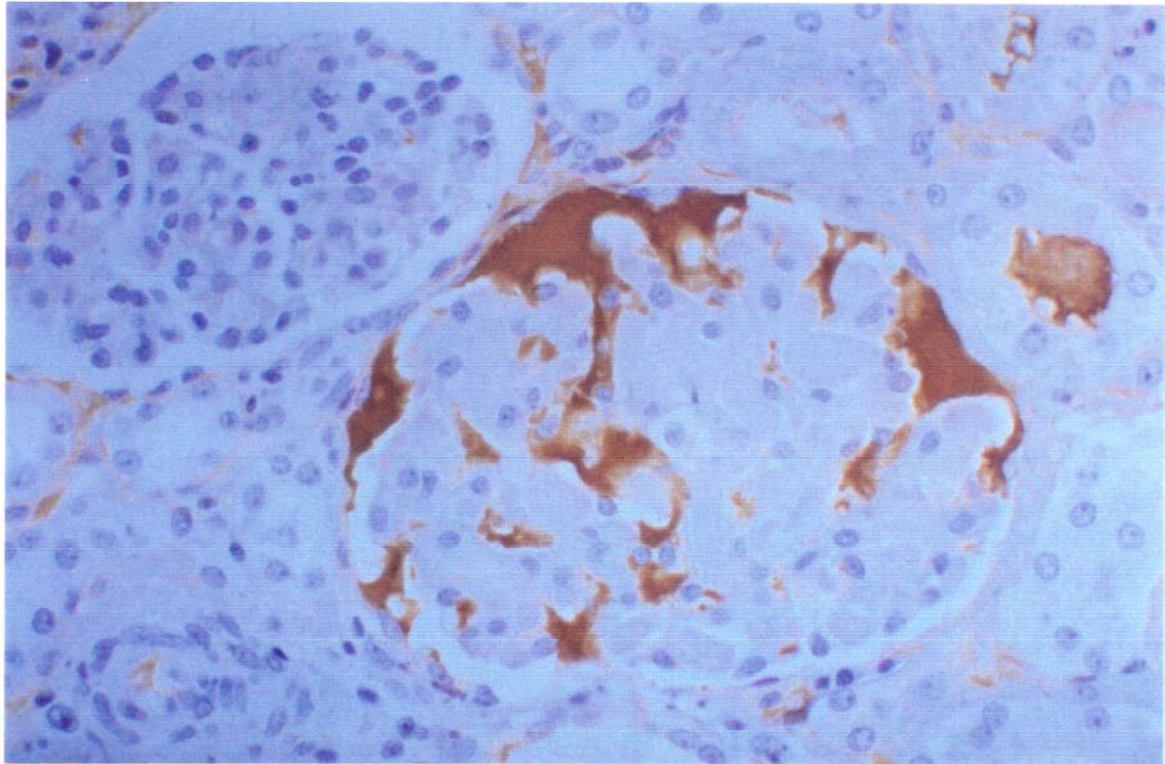
**Figura 29.-** 10 dpi. Riñón. Microtrombos y restos celulares (➔) en los capilares glomerulares. En el intersticio aparecen células en necrosis y hemorragias. H-E. x40.



**Figura 30.-** 10 dpi. Riñón. Positividad granular en los microtrombos de los capilares glomerulares y en hemorragias intersticiales. ABC anti-antígeno relacionado con el Factor VIII. x40.

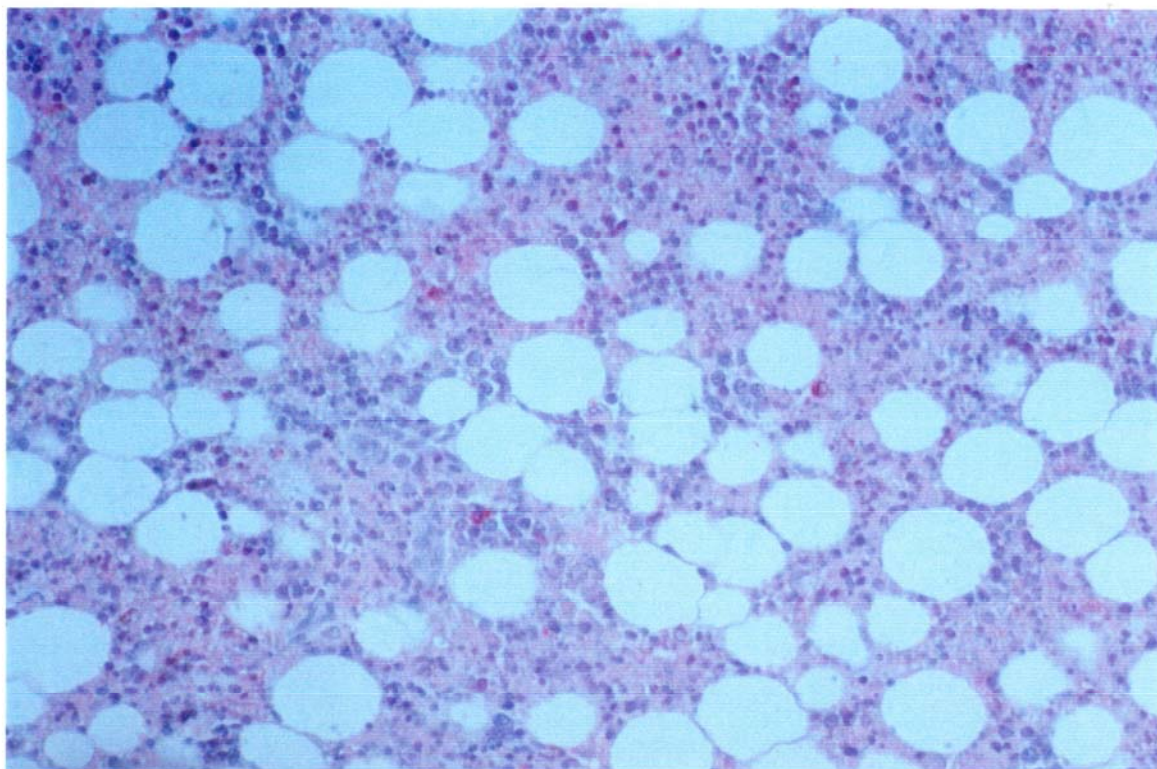


**Figura 31.-** 10 dpi. Riñón. Positividad en el mesangio glomerular (➡) y en los microtrombos de los capilares glomerulares (▶). ABC anti-IgM porcina. x40.

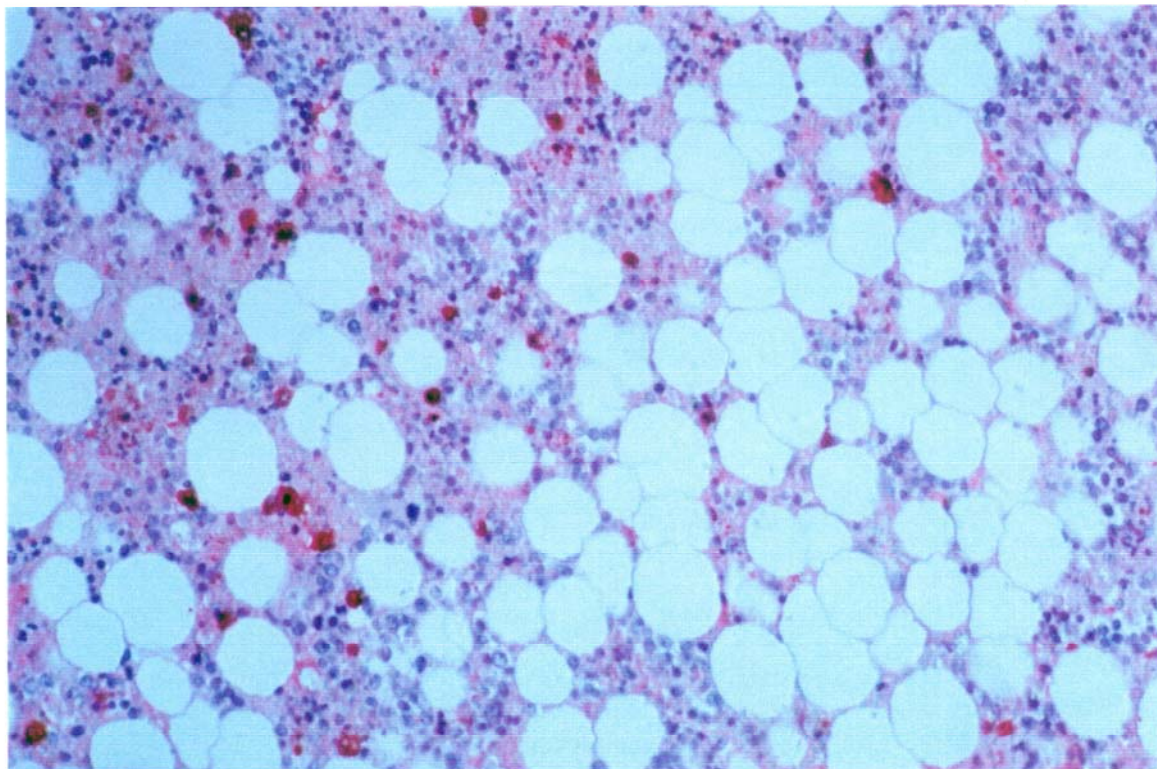


**Figura 32.-** 10 dpi. Riñón. Positividad intensa en el plasma de los capilares intersticiales, espacio de Bowman de un glomérulo con microtrombosis y en la luz tubular. ABC anti-IgG porcina. x40.

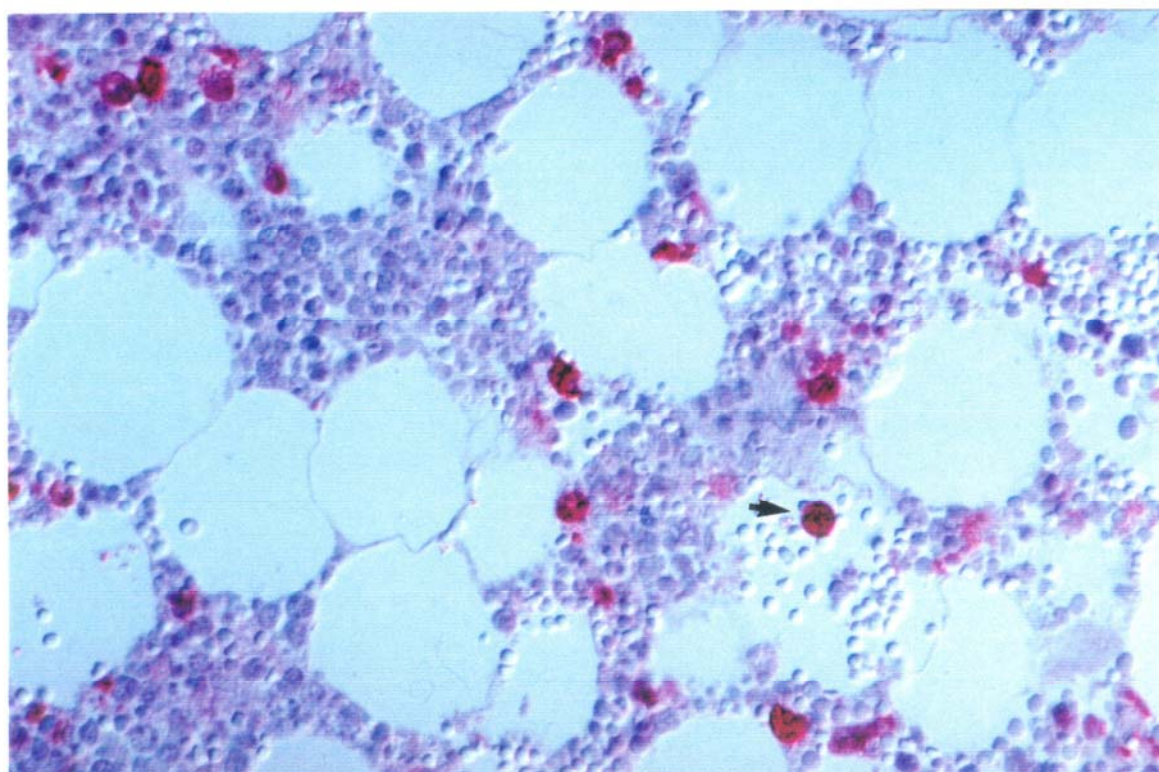




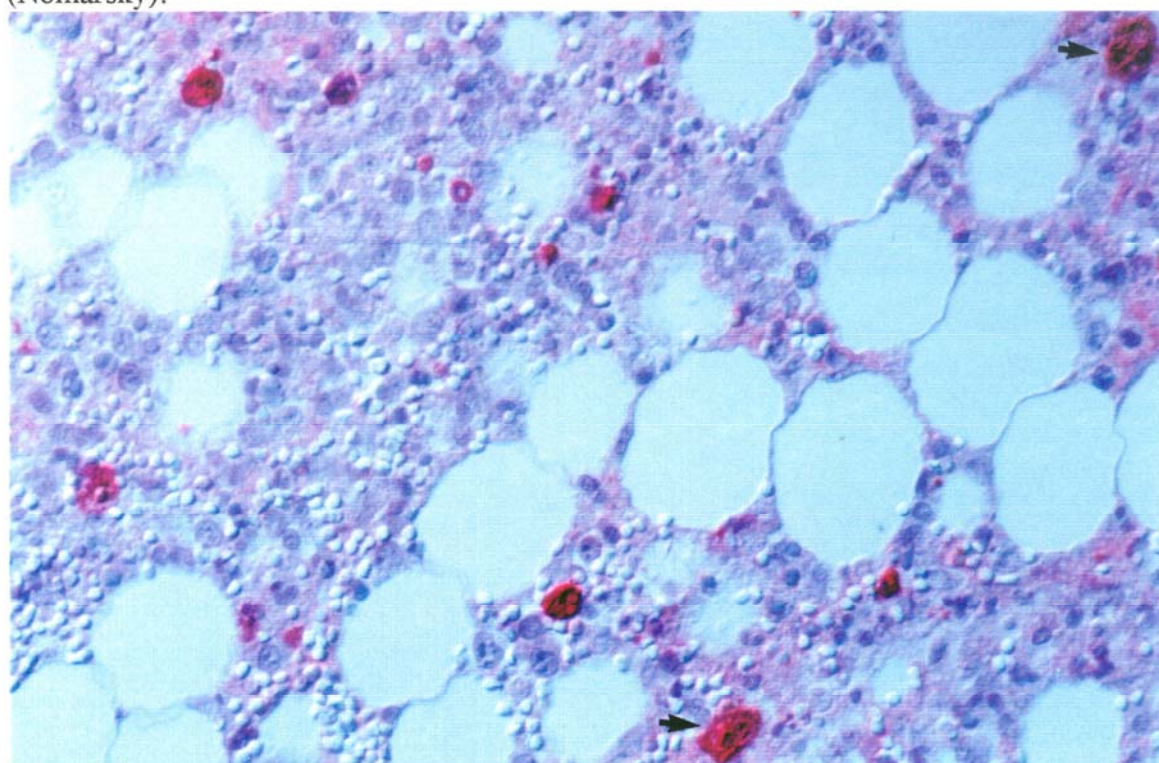
**Figura 33.-** 10 dpi. Médula ósea. Escasos monocito/ macrófagos con positividad difusa. Strp FA anti-PV73. x 20.



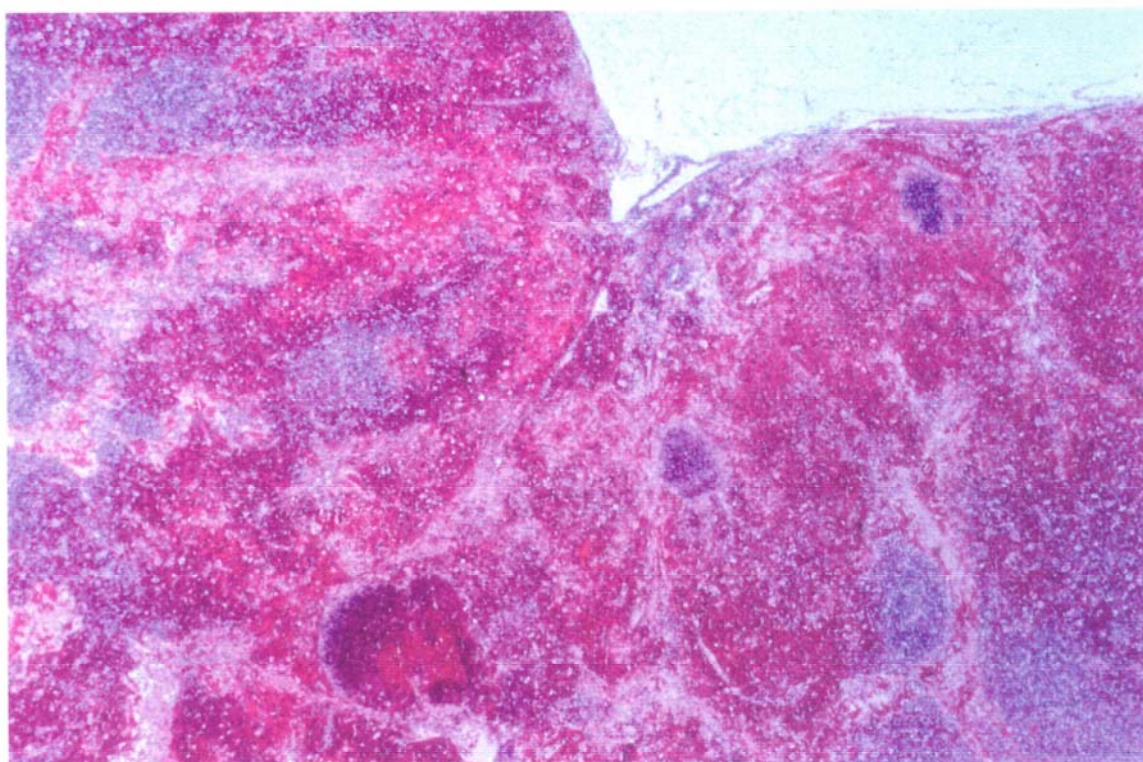
**Figura 34.-** 10 dpi. Médula ósea. Aumento de la inmunorreacción en los monocito/ macrófagos. Strp FA anti-PV73 con pretratamiento de elución. x 20.



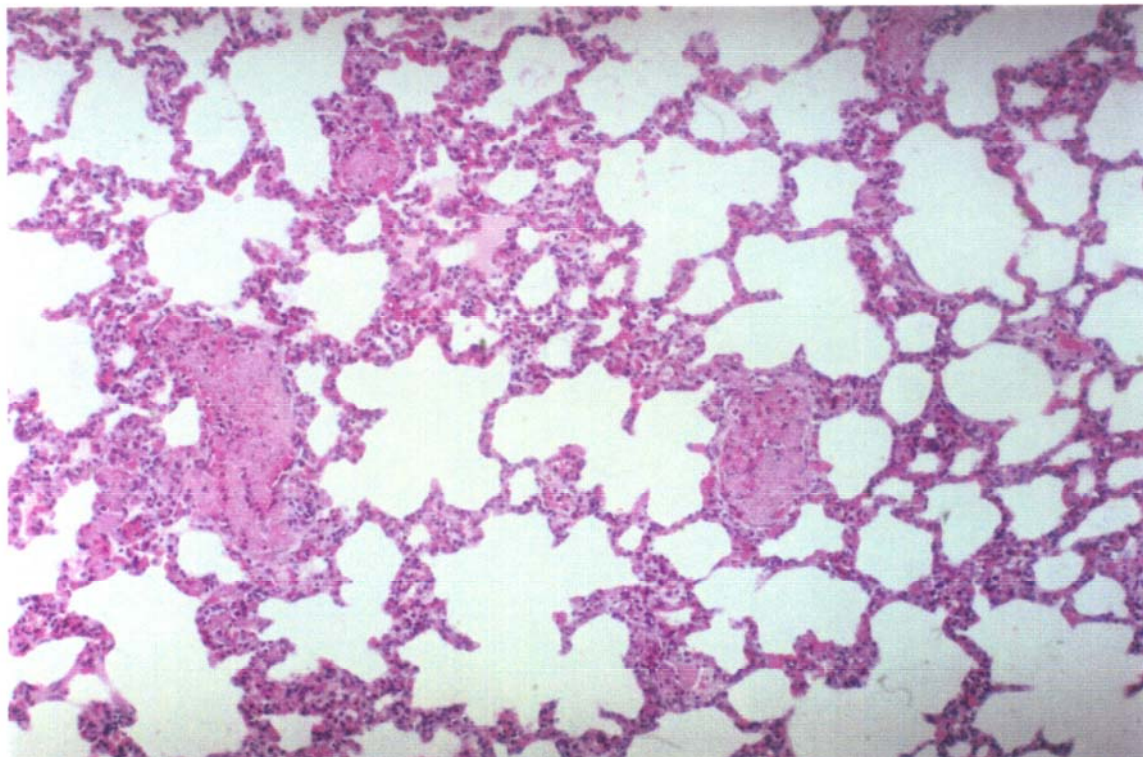
**Figura 35.-** 10 dpi. Médula ósea. Positividad difusa en monocito/ macrófagos, alguno mostrando hemoadsorción (↔), y restos celulares. Strp FA anti-PV73 con pretratamiento de elución. x 20. (Nomarsky).



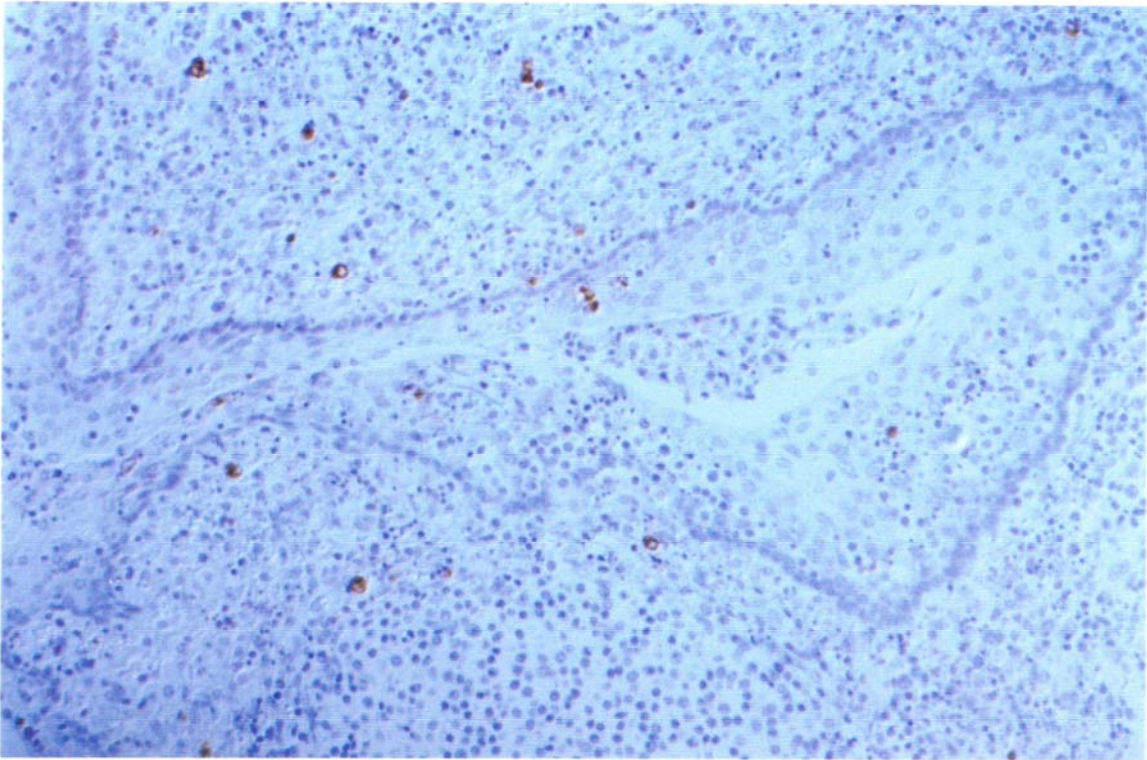
**Figura 36.-** 10 dpi. Médula ósea. Positividad en monocito/ macrófagos y megacariocitos (↔). Strp FA anti-PV73 con pretratamiento de elución. x 20. (Nomarsky).



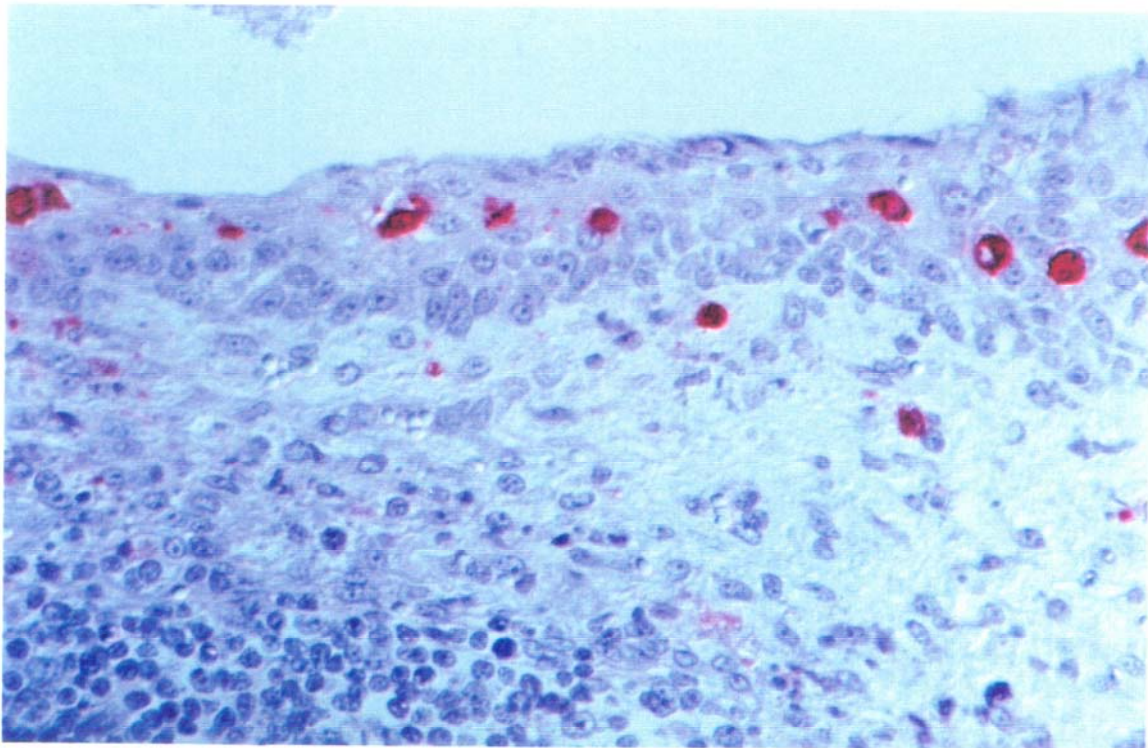
**Figura 37.-** 12 dpi. Ganglio Gastrohepático. Extensas hemorragias afectando a senos y a algunos folículos linfáticos. H-E. x4.



**Figura 38.-** 12 dpi. Pulmón. Múltiples trombos en vasos de pequeño y mediano calibre. En algunas zonas se observa edema alveolar. H-E. x10.



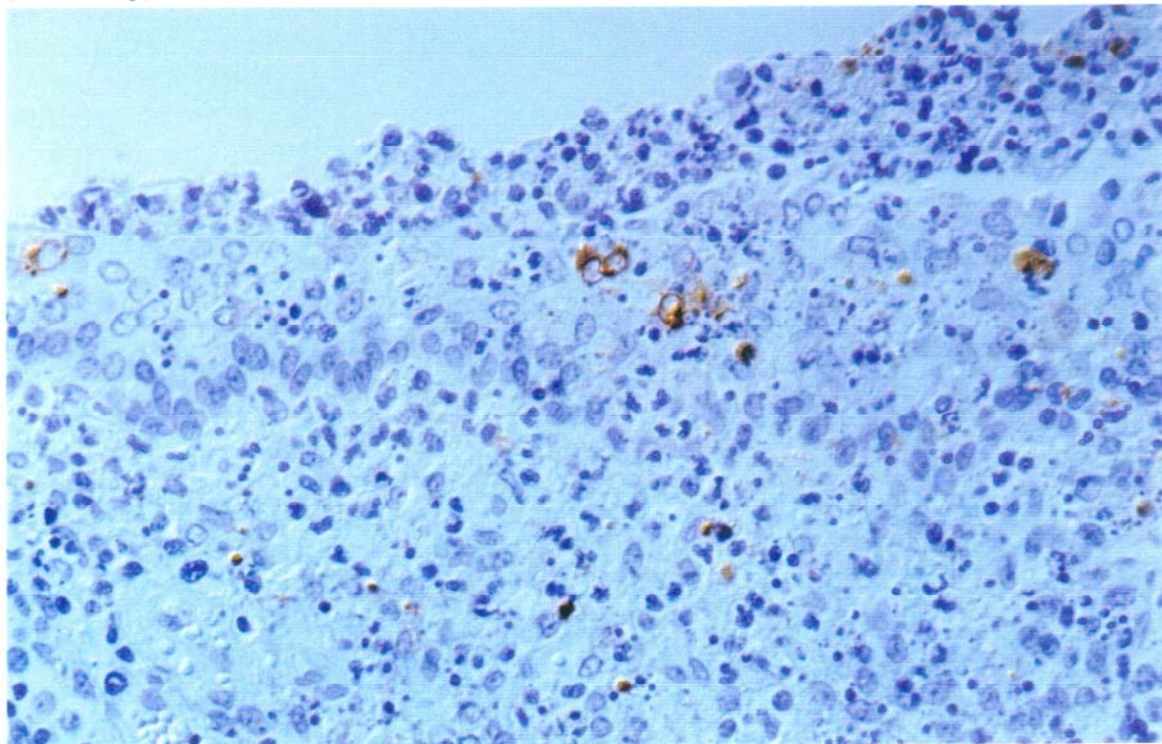
**Figura 39.-** 12 dpi. Tonsilas. Positividad en células intraepiteliales de las criptas y del estroma. ABC anti-PV73. x20. (Nomarsky).



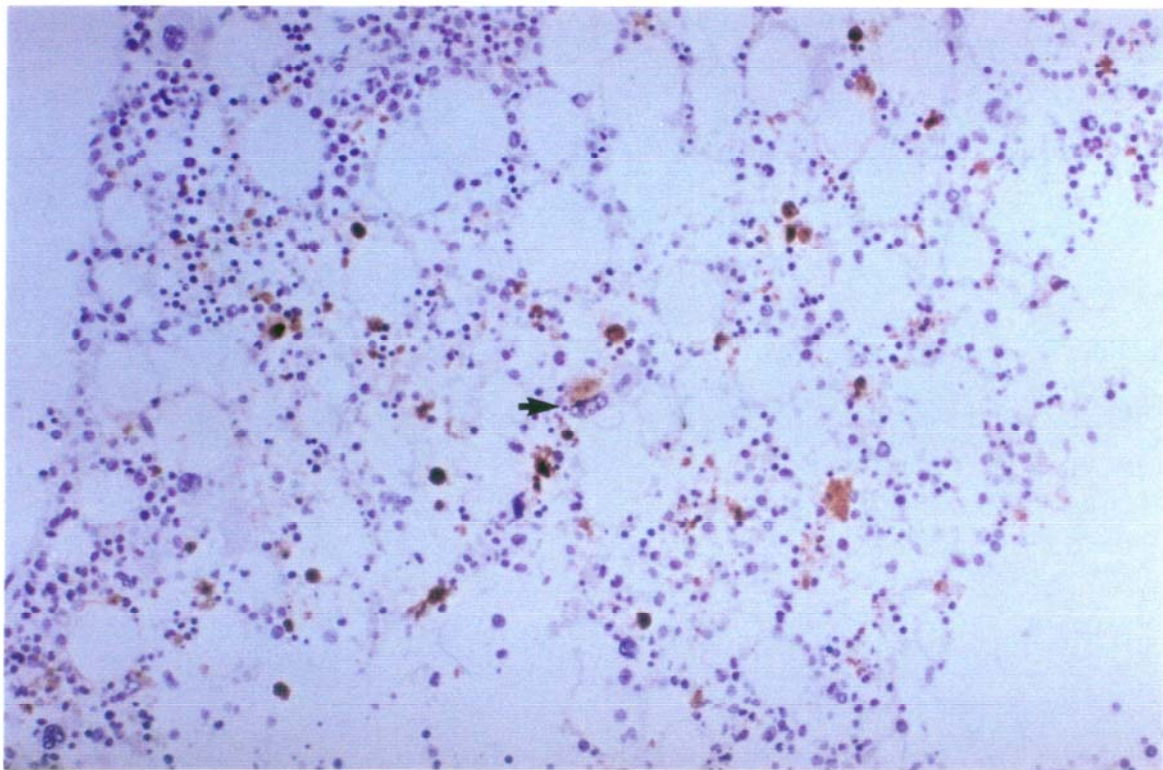
**Figura 40.-** 12 dpi. Tonsilas. Positividad difusa en células del epitelio de las criptas y del estroma. Strp FA anti-PV73. x40.



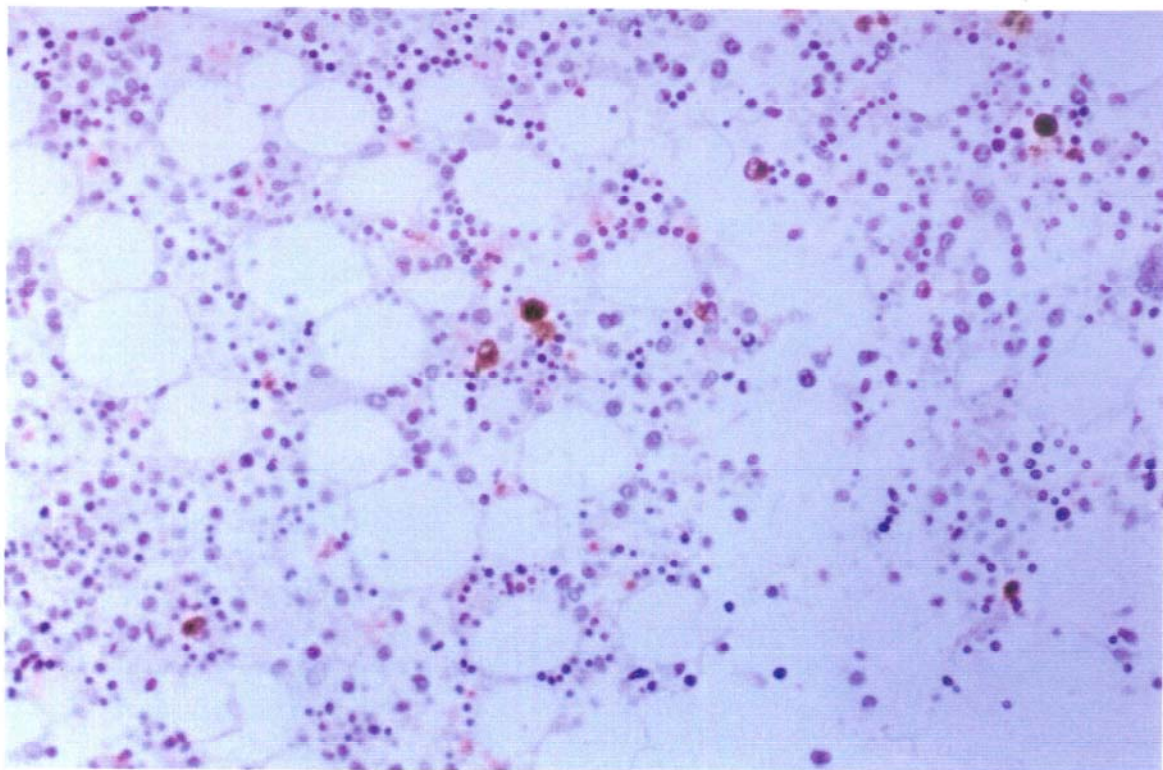
**Figura 41.-** 12 dpi. Tonsilas. Células epiteliales de las criptas con positividad citoplasmática para el antígeno vírico y para la citoqueratina. ABC anti-citoqueratina y Strp FA anti-PV73 (→). x20. (Nomarsky).



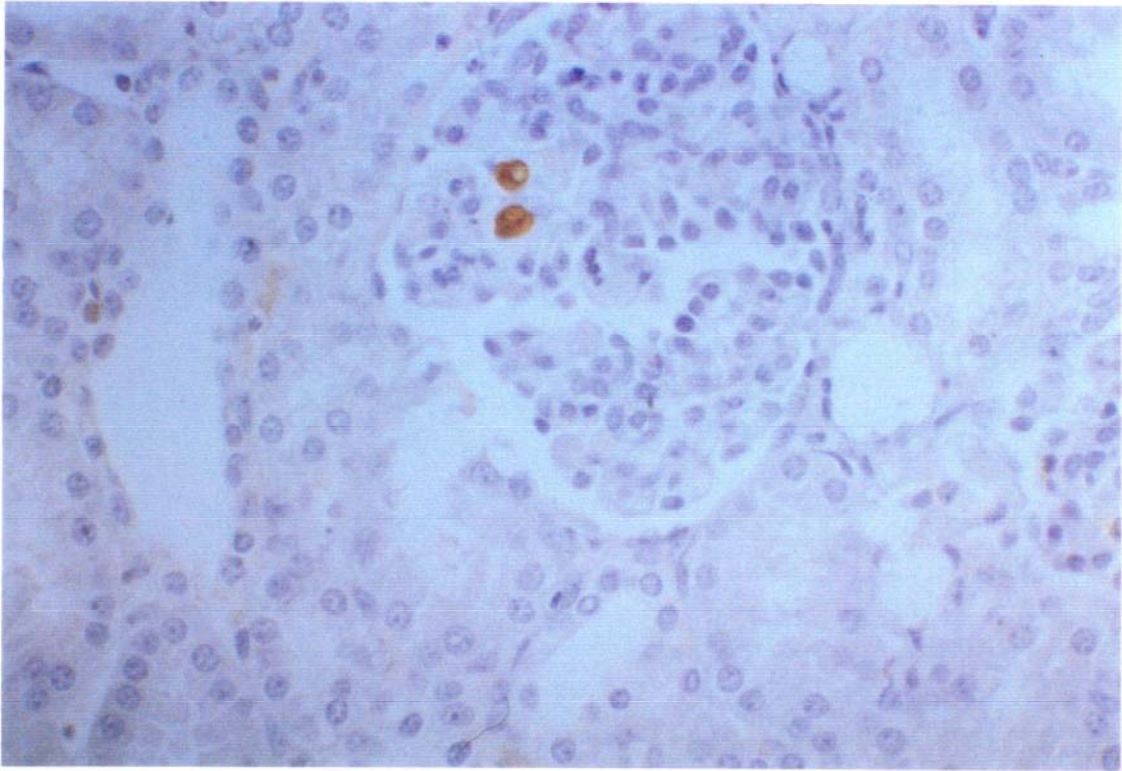
**Figura 42.-** 12 dpi. Tonsilas. Positividad en restos celulares del estroma y en células en necrosis del epitelio de las criptas. ABC anti-PV73. x40.



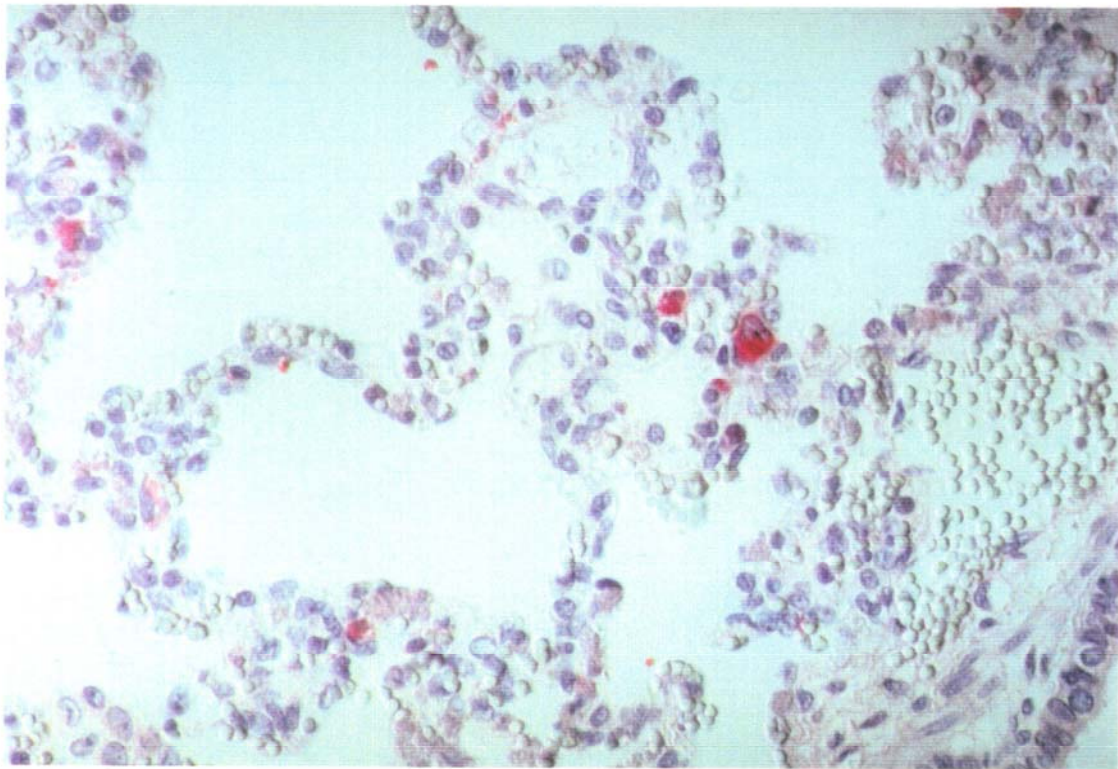
**Figura 43.-** 12 dpi. Médula Ósea. Positividad difusa y granular en monocito/ macrófagos, restos celulares y en un megacariocito (→). ABC anti-PV73. x20.



**Figura 44.-** 12 dpi. Médula Ósea. Positividad difusa y en foma de cuerpo de inclusión en monocito/ macrófagos. ABC anti-PV73. x20.



**Figura 45.-** 12 dpi. Riñón. Positividad difusa en células mononucleares mesangiales. ABC anti-PV73. x40.



**Figura 46.-** 12 dpi. Pulmón. Positividad en células mononucleares intravasculares. Strp FA anti-PV73. x40. (Nomarsky).

## VI. DISCUSIÓN



### **VI.1. Técnicas inmunohistoquímicas empleadas.**

En el VPPA han sido identificadas alrededor de 30 proteínas estructurales (Tabarés y cols., 1980; Wardley y cols., 1983; Viñuela, 1985), de ellas, la proteína mayoritaria de la cápside del virión es la PV73 (Tabarés, 1987a) localizada en las capas más externas de ésta (Carrascosa y cols., 1986). Esta proteína se expresa en las fases más tardías de la infección celular y se puede detectar mediante inmunofluorescencia a partir de las 8 horas postinfección en los cultivos celulares infectados (Whyard y cols., 1985; Tabarés, 1987a). La PV73 ha sido purificada (Tabarés y cols., 1981) y empleada, dada su capacidad inmunógena (Tabarés y cols., 1980; Federspiel y cols., 1991) y su estabilidad antigénica entre los distintos aislados (García Barreno y cols., 1986), como reactivo antigénico en la técnica de ELISA (Tabarés y cols., 1981; Sánchez-Vizcaño y cols., 1982) e inmunodot blot (Geering y cols., 1986) con resultados muy positivos en la lucha y control de la PPA (Sánchez-Vizcaño, 1986a).

La tecnología de los anticuerpos monoclonales permite obtener cantidades ilimitadas de anticuerpos con especificidad predecible y definida (Khöler y Milstein, 1979) dirigidos específicamente contra un epitopo del antígeno inoculado (Letchworth y Whyard, 1984; Campbel, 1985). La metodología de inmunización "in vitro" posee numerosas ventajas como la reducción en el uso de animales de experimentación, empleo de periodos cortos de inmunización, utilización

de escasas cantidades de antígeno y la posibilidad de controlar los parámetros de la respuesta inmune (Schreier, 1979; Federspiel y cols., 1991). En la PPA se han obtenido recientemente numerosos hibridomas productores de anticuerpos contra distintas proteínas del virus siendo los más numerosos caracterizados contra la PV73 (Sanz y cols., 1985; Federspiel y cols., 1991), y entre éstos el anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma 18B.G3 previamente caracterizado "in vitro" (Sanz y cols., 1985), ha sido utilizado con éxito como reactivo primario en nuestro estudio.

La aplicación de estos reactivos mono-específicos en las técnicas inmunohistológicas presenta numerosas ventajas derivadas de una mayor especificidad y de la posibilidad de amplificación mediante reactivos secundarios y terciarios (Taylor, 1985), con respecto al uso de sueros hiperinmunes homólogos (Fernández y cols., 1992a), los cuales requieren la utilización de anticuerpos secundarios anti-inmunoglobulinas de cerdo (IPI) o bien, la purificación y conjugación con biotina con los problemas de inespecificidad demostrados en trabajos previos (Fernández y cols., 1992a; Fernández y cols., 1992b, Pérez, 1992). La utilización del anticuerpo monoclonal anti-PV73 nos ha permitido, en comparación con el uso de un antisuero policlonal, una reducción cualitativa en las reacciones inespecíficas y un aumento cuantitativo del antígeno en las células infectadas por el virus. En la bibliografía consultada, no han sido empleados anticuerpos monoclonales en tejidos infectados con el VPPA e incluidos en parafina aunque si se ha descrito en un sólo trabajo, técnicas más avanzadas de detección del material genético del virus mediante la hibridación "in situ" en cerdos infectados experimentalmente (Galo y Nunes Petisca, 1990).

Numerosos autores han utilizado el formol tamponado como fijador para la detección de antígenos víricos empleando técnicas inmunohistológicas con lo que se consigue demostrar simultáneamente al agente patógeno específico en las lesiones que induce en el hospedador, permitiendo estudiar fases importantes de la patogenia de las enfermedades infecciosas (Allan y cols., 1989; Miller y Van Der Maaten, 1989; Narita y cols., 1989a; Narita y cols., 1989b; Haines, 1991).

En nuestros estudios los mejores resultados los hemos obtenido en los tejidos fijados mediante inmersión en formol tamponado al 10% durante 24-48 horas. Este fijador, utilizado

rutinariamente en los laboratorios de histología, conserva bien la morfología celular e inmoviliza los componentes proteicos si bien, tiempos largos de exposición afectan a la antigenicidad tisular al formarse numerosos enlaces cruzados entre las proteínas de tal manera que se "enmascaran" ciertos antígenos. Este efecto es particularmente importante cuando se intenta detectar epitopos particulares (Osborn y Weber, 1983; Battifora y Koipinski, 1986; Desnoyer y cols., 1990; Haines, 1991), dependiendo en cualquier caso de la susceptibilidad del epitopo (Battifora, 1991).

La utilización de las enzimas proteolíticas como pretratamiento en los cortes histológicos, libera algunos lugares antigénicos enmascarados por el formol (Battifora, 1991; Haines, 1991) a través de un mecanismo de acción desconocido (Battifora y Koipinski, 1986). El tiempo de digestión enzimática depende del tipo de tejido y del tiempo de fijación (Palacín, 1984; Battifora y Koipinski, 1986); en nuestro caso hemos sometido los cortes histológicos a tiempos variables de predigestión, estandarizándose la técnica a 10 min con la enzima pronasa al poseer ésta las ventajas, sobre la tripsina, de utilizarla a temperatura ambiente y sin control de pH. Con el empleo de esta enzima hemos mejorado los resultados en la detección de la PV73, de las inmunoglobulinas porcinas y la citoqueratina empleando anticuerpos monoclonales y del antígeno relacionado con el factor VIII de la coagulación utilizando un suero policlonal.

Aunque algunos autores han detectado cierta cantidad de antígeno del VPPA en cerdos perfundidos intravascularmente con glutaraldehído (Fernández y cols., 1992a; Fernández y cols., 1992b), para ello fue necesario la utilización de detergentes no iónicos con el fin de desenmascarar los antígenos virales (Meehan y cols., 1989; Fernández y cols., 1992a). El glutaraldehído es mejor conservador morfológico e inmovilizador proteico que el formol si bien, su capacidad de formar puentes cruzados es superior (Braudtzaeg, 1982; Hogan y Smith, 1982). En nuestros resultados la cantidad de proteína PV73 detectada en los cortes fijados con glutaraldehído fue muy inferior a la observada en formol, no mejorando significativamente, en nuestro caso, con los distintos pretratamientos utilizados. Por esta razón y, aunque la perfusión vascular permite una mejor observación estructural de los elementos celulares presentes en el interior de los vasos (Atwal y cols., 1989; Sierra y cols., 1990a; Sierra y cols., 1991), consideramos el formol un fijador más adecuado que el glutaraldehído para la detección de la proteína PV73 en tejidos.

Por otra parte, el alcohol fija las estructuras tisulares mediante la coagulación de los componentes proteicos con lo que se logra una buena conservación de la antigenicidad tisular en contraposición a una lábil inmovilización antigénica y, una deficiente conservación morfológica con respecto a la fijación aldehídica (Braudtzaeg, 1982; Palacín, 1984). Algunos autores han utilizado la fijación en alcohol y el procesamiento de Sainte-Marie (1962) para la demostración de antígenos víricos (Fernández y cols., 1989; Wholsein y cols., 1990), bacterianos (Martín de las Mulas y cols., 1990), inmunoglobulinas (Brandtzaeg y Rognum, 1984), etc. En nuestro caso esta fijación no mejoró los resultados obtenidos con el formol sino que contrariamente a lo que inicialmente esperábamos, la PV73 fue detectada en escasa cantidad y con problemas de inespecificidad. Aunque no podemos establecer la razón de estas importantes diferencias, ésta debe residir necesariamente en la conservación del epitopo de la PV73 con los distintos fijadores (Battifora, 1991).

Las distintas técnicas inmunohistológicas constituyen una importante herramienta para el diagnóstico e investigación en patología veterinaria (Haines y Clarck, 1991). En la PPA se han utilizado técnicas de inmunofluorescencia sobre tejidos fijados por congelación (Boulanger y cols., 1967; Colgrove y cols., 1969; Pan, 1987), siendo sus principales ventajas por una parte la rapidez en su utilización y, por otra su sensibilidad al ser este fijador el mejor conservador de la antigenicidad tisular (Ditzel y cols., 1991). Más recientemente se han utilizado técnicas de inmunoperoxidasa sobre tejidos incluidos en parafina (Fernández y cols., 1992a; Fernández y cols., 1992b), siendo sus principales ventajas las de obtención de cortes permanentes y la conservación de los detalles morfológicos. En estos trabajos las técnicas que mostraron los mejores resultados fueron las que utilizaron la Avidina-Biotina-Peroxidasa (ABC) y como anticuerpo primario un suero policlonal biotinado anti-VPPA (Fernández y cols., 1992a; Pérez, 1992).

En las determinaciones inmunohistológicas de nuestro estudio se utilizaron dos técnicas caracterizadas por una alta especificidad y capacidad de amplificación mejorando significativamente los trabajos previos (Fernández, 1992a); por una parte la ABC (Hsu y cols., 1981) y por otra la Estreptavidina conjugada con la fosfatasa alcalina Strp FA (Palacín, 1984) esta última capaz de aumentar más de cuatro veces la respuesta obtenida con el ABC (Nagle, 1983; Giorno, 1984). En este sentido, hemos observado que en tejidos donde era muy escasa la cantidad

de antígeno PV73 detectado con la ABC, aumentó con la Strp FA; por otra parte, al ser la PPA una enfermedad hemorrágica, la presencia de pigmento formólico y/o hemosiderina puede dar lugar a falsas interpretaciones al emplear la técnica del ABC, lo que se obvia en mayor medida con la Strp FA.

Al igual que en trabajos previos (Chem y cols., 1987; Mínguez y cols., 1988) la utilización de inmunotinciones dobles mediante el uso de las enzimas peroxidasa y fosfatasa alcalina, nos ha permitido la demostración simultánea de dos antígenos, la PV73 y la citoqueratina de las células del epitelio tonsilar lo que definió la localización precisa de la PV73 en este órgano. Igualmente, la técnica de la Strp FA nos ha evitado la tinción inespecífica descrita en los mastocitos con la ABC, este fenómeno descrito por Bussoleti y Gugliotta en 1983, atribuido al pH del tampón también fue observado por otros autores utilizando el ABC en la PPA (Fernández y cols., 1992a; Fernández y cols., 1992b; Pérez, 1992).

Los cerdos infectados con el VPPA producen anticuerpos desde los 3-4 dpi (Hamdy y Dardiri, 1980; Wardley y Wilkinson, 1980b; Pastor y cols., 1990), detectándose altas concentraciones plasmáticas a partir de los 9 dpi (Sánchez-Vizcaíno y cols., 1983b, Mebus, 1987; Mebus, 1988). La sensibilidad de la inmunofluorescencia en improntas o cortes de tejidos fijados por congelación (Colgrove, 1968; Dardiri y Hess, 1970; Pan, 1987) disminuye en animales hiperinmunes debido al bloqueo de los antígenos virales por parte de los anticuerpos originados durante la evolución de la enfermedad (Heuschele y cols., 1966; Sánchez Botija y cols., 1977), este fenómeno se demostró en varios animales que mostraron seroconversión y un aumento de la inmunorreactividad tisular para la PV73 después de aplicar la técnica de la elución, puesta en práctica por otros autores con el objetivo de desenmascarar antígenos virales en enfermedades crónicas caracterizadas por la presencia de inmunocomplejos (Porter y cols., 1973; Wholsein y cols., 1990). En nuestro caso, con la técnica de la elución, hemos podido observar un mayor número de monocito/ macrófagos inmunopositivos a la PV73 desde los 8 dpi, siendo muy significativo el aumento de inmunorreactividad en los megacariocitos de médula ósea de los animales sacrificados a los 10 dpi los cuales presentaron las mayores tasas de anticuerpos en sangre. Estos datos están en concordancia con los trabajos de otros autores (Edwards y cols. 1985c; Fernández y cols., 1992c) en los que se indica la participación de la respuesta inmune humoral en distintos fenómenos que acontecen en la PPA aguda y subaguda. Por otra parte indica

la necesidad de utilizar la técnica de la elución para la detección de la PV73 en cerdos infectados de forma crónica e inaparente como puede ser el caso de los jabalíes (Fernández, comunicación personal).

La inmunofluorescencia "in vitro", empleando anticuerpos monoclonales anti-PV73 ha localizado esta proteína en el citoplasma de células infectadas en forma difusa o globular (Sanz y cols., 1985). En nuestros resultados, las células pertenecientes y no pertenecientes al SMF han mostrado una positividad difusa, granular o globular, lo que está en concordancia con las observaciones referenciadas al utilizar anticuerpos policlonales sobre células infectadas "in vivo" y/o "in vitro" (Colgrove y cols., 1969; Castro Portugal y cols., 1976; Carvalho y cols., 1988; Fernández y cols., 1992b). La inmunotinción difusa correspondería a partículas víricas, observadas ultraestructuralmente, maduras e inmaduras dispersas o asociadas a ribosomas (Castro Portugal y cols., 1976). Las estructuras globulares inmunorreactivas que hemos demostrado con ambas técnicas (ABC y Strp FA) se corresponderían con las zonas de replicación o cuerpos de inclusión descritos con el microscopio electrónico (Moura Nunes, 1975; Sierra y cols., 1987; Carrasco, 1988; Gómez-Villamandos, 1988; Sierra y cols., 1990a; Sierra y cols., 1990b) y que aparecen en las fases finales de la infección celular cuando los procesos citopáticos son más manifiestos (Castro Portugal y cols., 1976; Carvalho y cols., 1988; Sierra y cols., 1989; Sierra y cols., 1990). Finalmente, la inmunorreacción en múltiples gránulos distribuidos por el citoplasma podría corresponder a fagosomas conteniendo material vírico (Sierra y cols., 1987; Carrasco, 1988; Gómez-Villamandos, 1988) si bien otros autores, consideran que son fenómenos previos a la confluencia en un gran glóbulo único (Castro Portugal y cols., 1976; Pan y cols., 1980; Carvalho y cols., 1988). En los restos celulares hemos observado frecuentemente inmunorreactividad granular pudiendo corresponder a partículas víricas, maduras o inmaduras, asociadas a las células en necrosis, lo que ha sido descrito con frecuencia en estudios ultraestructurales (Wardley y Wilkinson, 1977b; Sierra y cols., 1990a).

## VI.2. Patología de la PPA.

Las lesiones ganglionares macroscópicas consistieron en un ligero aumento de tamaño y edematización a los 4 y 6 dpi presentándose, a partir de los 8 dpi, intensas hemorragias subcapsulares, especialmente, en los ganglios gastrohepáticos y renales, observaciones que coinciden con las apuntadas por la mayoría de autores ya desde los primeros trabajos lesionales de la PPA (Montgomery, 1921; Colgrove y cols., 1969; Mebus, 1987; Jubb y cols., 1993; Sierra y cols., 1993).

Histológicamente las áreas primaria y más intensamente afectadas fueron las subcapsulares, interfoliculares y las vénulas postcapilares, lesiones que se fueron intensificando con el curso de la enfermedad como se ha descrito en infecciones con distintos aislados virales (Nunes Petisca y cols., 1977; Mebus, 1988; Wilkinson, 1989). Estas zonas tienen como particularidad citológica la abundancia de células reticulares con una marcada capacidad de fagocitosis, siendo éstas las células que en primer lugar padecen procesos de degeneración y necrosis (Colgrove y cols., 1969; Mebus y Dardiri, 1979), como se ha evidenciado en nuestro trabajo experimental.

Estas observaciones indicarían que el virus, después de una multiplicación primaria en la puerta de entrada (en nuestro caso en macrófagos intersticiales del punto de inoculación), se vehicularía a través de linfáticos al ganglio regional y al torrente sanguíneo (viremia 1<sup>a</sup>) diseminándose hasta los órganos con un SMF bien desarrollado como son primariamente los ganglios, el bazo y la médula ósea, y también a otros órganos como el pulmón, hígado, riñón, etc (Heuschele, 1967; Dardiri y Hess, 1970) donde se replicaría en sus células blanco naturales los monocito/ macrófagos (Enjuanes y cols., 1977; Casal y cols., 1984). En ellos se produce una infección productiva demostrada por la alta cantidad de proteína PV73 observada a partir de las 36 hpi (Colgrove y cols., 1969) en este tipo celular, lo que repercute considerablemente en el título de virus en sangre (viremia 2<sup>a</sup>) fenómenos demostrados virológica e inmunohistológicamente en nuestro trabajo.

La destrucción celular en los senos linfáticos y la llegada de eritrocitos por los vasos linfáticos aferentes desde los órganos drenados explicaría en parte, la observación de

una hemorragia ganglionar progresiva a partir de los 6-8 dpi coincidiendo con una mayor intensidad lesional de los órganos drenados. Así, la marcada hemorragia, característica de la PPA, en los ganglios gastrohepáticos y renales coincide con el aumento de las hemorragias multifocales en el hígado y en el riñón. Esto explica que en los ganglios mandibulares y mediastínicos las hemorragias fueran menos intensas de la misma forma que no se apreciaron graves lesiones en las áreas de drenaje correspondientes. Confirmando esta idea los ganglios mediastínicos, que sólo mostraron lesiones intensas en el animal muerto (7 dpi).

En algunos ganglios linfáticos fueron observados muy escasos monocitos con PV73 a los 2 dpi correspondiéndose con la baja tasa de virus en sangre en este día postinoculación, la inmunorreactividad aumentó paralelamente con la viremia desde los 4 dpi distribuyéndose aquella, desde las zonas subcapsulares a las interfoliculares, siendo en todos los casos, los monocito/macrófagos las células mayormente implicadas como destacan todos los autores (Colgrove y cols., 1969; Mebus, 1987; Mínguez y cols., 1988). Esta alta concentración vírica en los ganglios los señalan como órganos importantes de elección en el diagnóstico de la PPA (Boulanger y cols., 1966; Heuschele; 1967; Dardiri y Hess, 1970; Sánchez Botija y cols., 1977; Greig, 1972).

Los folículos linfoides de todos los órganos linforreticulares estudiados han sido las estructuras que con menor intensidad y más tardíamente se lesionaron, fenómenos también descritos por distintos autores (Maurer y cols., 1958; Moulton y Coggins, 1968; Mebus, 1987). En este sentido hemos observado necrosis aisladas en los centros germinativos ganglionares desde los 4 y 6 dpi, afectando a células ampulosas de núcleos poco teñidos que dejaban un espacio claro con abundantes restos celulares; estas células se clasifican como pertenecientes al SMF y más concretamente como células presentadoras de antígeno (CPA) (Diebold, 1986) las cuales mostraron inmunorreactividad específica (PV73). Estos fenómenos están de acuerdo con las observaciones hechas por otros autores quienes, con aislados moderadamente virulentos, propugnan la hipótesis de que estos aislados no provocan una rápida citolisis sino que se establece una infección productiva con baja tasa de destrucción celular de las células del SMF lo que favorece una respuesta inmunológica en contraposición a la infección con aislados muy virulentos que causan la destrucción rápida y masiva del SMF (Mebus, 1987; Mínguez y cols., 1988).

A partir de los 6 dpi observamos un aumento progresivo de linfocitos en degeneración y



necrosis sin presentar antígeno vírico, esta observación corrobora la afirmación de la mayoría de los investigadores que no han encontrado antígeno vírico en las poblaciones linfoides (Casal y cols., 1984; Mínguez y cols., 1988). Esto contrasta con escasos estudios "in vitro" (Wardley y cols., 1977c) e "in vivo" (Moulton y Coggins, 1968; Colgrove y cols., 1969) que señalan la replicación del VPPA en los linfocitos. De nuestros resultados se desprende que la necrosis de los linfocitos no se debe a la acción directa del virus sino a mecanismos indirectos como pudiera ser el aumento de prostaglandina E2 (Anderson, 1986), el efecto tóxico de las enzimas liberadas por macrófagos destruidos, los procesos hipóxicos derivados de las lesiones vasculares y el acúmulo progresivo de sangre en el sistema de conducción-filtración ganglionar (Colgrove y cols., 1969; Mebus, 1987). Esta necrosis linfocitaria colaboraría a establecer la ligera linfopenia observada a partir de los 4 dpi y que ha sido indicada con frecuencia en infecciones con el VPPA (Sánchez-Vizcaíno y cols., 1981; Genovessi y cols., 1988).

Utilizando aislados moderadamente virulentos como el empleado por nosotros (E75), las muertes se describen desde los 6-10 días del comienzo de la fiebre hasta los 25-45 dpi o más tarde (Slauson y Sánchez Vizcaíno, 1981; Ordás, 1987; Martín-Fernández y cols., 1989; Sierra, 1993) encontrándose de forma constante un cuadro clínico-lesional que también ha sido observado en los cerdos miniatura. Así, en el animal muerto a los 7 dpi se presentaron las lesiones ganglionares necrótico-hemorrágicas más intensas características de la PPA aguda (Sánchez-Vizcaíno, 1986a); sin embargo, el otro animal del mismo lote presentaba unas lesiones intermedias en intensidad entre los lotes III y IV, lo que confirma el papel del hospedador en su interacción con el virus (Mebus, 1988).

Estas diferencias dependientes del hospedador y del virus se volvieron a observar a los 10 y 12 dpi así, se presentó una ligera hiperplasia folicular (Konno y cols., 1971a) junto a lesiones hemorrágicas, lo que se puede interpretar como una respuesta inmune que quedaría constatada en los animales sacrificados a los 10 dpi por la alta tasa de anticuerpos encontrada en sangre. Sin embargo, los animales sacrificados a los 12 dpi no presentaron anticuerpos anti-virus en circulación. El hecho de que ambos animales mostraran lesiones ganglionares y viremias similares, pero concentraciones de anticuerpos en sangre tan dispares justifica los diferentes mecanismos que el virus posee para desarrollar lesiones similares (Pan, 1987; Mebus, 1988; Fernández y cols., 1992b).

El bazo mostró una moderada esplenomegalia hiperémica que progresó de forma evidente desde los 6 dpi hasta el final de la enfermedad lo que se corresponde con las descripciones lesionales más llamativas y constantes descritas en la PPA aguda (Montgomery, 1921; DeKock, 1940; Moulton y Coggins, 1968), esta lesión que como veremos se asocia con una alta tasa de virus en este órgano (Heuschele, 1967; Plowright y cols., 1968; Greig, 1972) hace del mismo, una de las muestras de elección en el diagnóstico de la PPA (Sánchez-Vizcaíno, 1986a).

Las lesiones que hemos observado desde los 4 dpi se localizan inicialmente en la pulpa esplénica roja y, especialmente en las zonas marginales y vainas de Schweigger-Seidel, todas ellas, áreas con una rica población de células reticulares con gran capacidad de fagocitosis que constituyen las células primarias del VPPA (Enjuanes y cols., 1977; Fernández y cols., 1992a). En estas áreas se observó un aumento progresivo de células sanguíneas así como fenómenos degenerativo-necróticos asociados a la PV73. Estos fenómenos fueron muy marcados a partir de los 6 dpi y se asociaron a un aumento de sangre en la PER y a la aparición de fenómenos de necrosis en la PEB. La destrucción del armazón esplénico por la acción directa del virus sobre las células del SMF y la indirecta, ya apuntada a nivel ganglionar, son las responsables de las lesiones observadas en el animal muerto (PPA aguda) y en los animales sacrificados a los 10 y 12 dpi representando las fases finales de la PPA aguda-subaguda en las infecciones por aislados moderadamente virulentos (Moulton y Coggins, 1968; Konno y cols., 1971a; Konno y cols., 1972; Mebus, 1988).

Un dato a tener en cuenta que confirma lo anteriormente expuesto viene dado por la secuencia en la distribución y cantidad de PV73 en el bazo. Ésta se observó en escasos monocito/macrófagos de la PER a los 2 dpi para aumentar paralelamente a la viremia desde los 4 dpi, con una localización más acentuada en las áreas marginales y vainas macrofágicas. Esta distribución concuerda con la obtenida desde las 36 hpi por otros autores en estudios realizados empleando la técnica de la inmunofluorescencia (Boulanger y cols., 1967; Colgrove y cols., 1969), de la inmunoperoxidasa (Mínguez y cols., 1988; Fernández y cols., 1992a; Fernández y cols., 1992b) y la hibridación "in situ" (Galo y Nunes Petisca, 1990). La localización antigénica vuelve a constatar la no infección de los linfocitos así como el desarrollo de lesiones similares a las descritas en los ganglios con la particularidad de que este órgano se lesiona gravemente de forma constante siendo comparable con las lesiones de los ganglios gastrohepáticos y los renales, lo que

estimamos se debe a que en el bazo confluyen las características básicas en el desarrollo de las lesiones de la PPA aguda y subaguda: ser un órgano muy rico en células macrofágicas y estar integrado en la circulación sanguínea con función de drenaje sistémico.

Las lesiones de la médula ósea comenzaron a evidenciarse desde los 4 dpi en monocito/macrófagos con degeneración celular y destrucción progresiva de la arquitectura del órgano en el que, de la misma forma, se observó un la retención de sangre y disminución de las células hematopoyéticas lo que también fue observado por Nunes Petisca y Martins Gonçalves en 1976 en los escasos trabajos que sobre la médula ósea en la PPA se encuentran publicados.

Algunos autores han detectado en la médula ósea el VPPA en cantidades crecientes, desde las 48 hpi (Heuschele, 1967; Plowright y cols., 1968) y antígeno VPPA mediante inmunofluorescencia (Colgrove y cols., 1969) e hibridación "in situ" (Galo y Nunes Petisca, 1990); en nuestro trabajo, la PV73 se detectó en numerosos monocito/macrófagos desde los 4 dpi aumentando progresivamente el número de células inmunopositivas no macrofágicas desde los 6 dpi.

La presencia de la PV73 en células del SMF en la médula continua justificando el papel primario de éstas como células blanco del virus de la PPA (Enjuanes y cols., 1977; Casal y cols., 1984). La infección de los megacariocitos por el VPPA ha sido demostrada por algunos autores (Colgrove y cols., 1969; Pan, 1987) así, Edwards y cols en 1985b utilizando el aislado República Dominicana y la técnica de la inmunofluorescencia, encontraron inmunopositividad en un 2-10% de megacariocitos; en nuestro trabajo, el número de megacariocitos infectados fue considerablemente superior del 25 al 30% en el animal muerto y en los sacrificados a partir de los 8 dpi, lo cual indica una mayor participación de la infección como causa de la trombocitopenia que la publicada por Edwards y cols., 1985b y Edwards y cols., 1985c.

Por otra parte, destacamos como muy significativo el aumento de megacariocitos infectados desde los 6 dpi, incremento que se observó paralelamente a una mayor destrucción de los macrófagos próximos. Estas células no macrofágicas son, después de los monocito/macrófagos, las más numerosas conteniendo PV73 en todo el curso de la enfermedad, lo que indica una mayor susceptibilidad de los megacariocitos a ser infectados por el VPPA que la

indicada hasta el momento (Edwards y cols., 1985b). La infección de los megacariocitos constituye un dato interesante en la patogenia de la PPA, ya que un elevado número de animales mueren con trombocitopenia; la infección de estas células puede establecerse por la unión del virus a un receptor de membrana (Alcamí y Viñuela, 1991) que podría existir también en los megacariocitos, al derivar de un precursor hematopoyético común. Otra posibilidad estaría condicionada a mecanismos inmunomediados lo que si ha sido demostrado en la PPA con aislados moderadamente virulentos (Edwards y cols., 1985c) si bien, estos autores no demostraron la presencia simultánea de inmunoglobulinas y antígenos del VPPA en los megacariocitos, fenómeno que si fue evidente tras la elución en el presente trabajo, y que puede estar relacionado con los mecanismos inmunomediados indicados por Edwards y cols. en 1985.

Los megacariocitos inmunorreactivos presentaban efectos citopáticos semejantes a los observados en los monocito/ macrófagos, con hipercondensación cortical y/o picnosis y cariorexis. En los animales sacrificados a los 12 dpi se observó hiperplasia de megacariocitos, tanto infectados (25%), como no infectados (75%), lo que se correspondió con el aumento del número de plaquetas en sangre. Estos datos y la ausencia de inmunoglobulinas anti-virus en megacariocitos y sangre en estos animales (12 dpi) reforzaría la hipótesis de la participación de fenómenos inmunomediados en los animales del lote V (10 dpi).

Estos fenómenos necesitarían estudiarse con mayor profundidad ya que la adherencia de virus, inmunoglobulinas y complemento a plaquetas no se ha demostrado. Las pruebas realizadas en el presente estudio con esta finalidad resultaron igualmente negativas (datos no introducidos) lo que confirma los estudios ultraestructurales en los que se han observado muy pocas plaquetas conteniendo virus (Nesser y cols., 1986). Aunque estos datos contradicen la hipótesis de la trombocitopenia inmunomediada y abogan por una coagulopatía de consumo, en ninguno de los trabajos realizados hasta el momento, se ha desarrollado un estudio completo morfológico-fisiológico para confirmar estos mecanismos.

En nuestro trabajo, hemos considerado las tonsilas como un órgano de replicación secundaria al emplear la vía de infección intramuscular y no la oronasal, en la que este órgano se comporta como puerta de entrada y lugar primario de replicación vírica (Heuschele, 1967; McVicar, 1984; Ekue y cols., 1989).

En contraste con las hemorragias macroscópicas descritas en las tonsilas (Moulton y Coggins, 1967), en nuestros resultados, no hemos observado hemorragias a pesar de la intensa destrucción celular observada en estos animales. Por el contrario y como en las descripciones del bazo, ganglios y médula ósea, en las tonsilas, los monocito/ macrófagos subepiteliales y en las regiones interfoliculares fueron las primeras células, a los 4 dpi, con procesos degenerativos. A partir de los 6 dpi se observó una intensa infiltración leucocitaria en el epitelio de las criptas, siendo el animal muerto y los sacrificados a los 12 dpi los que presentaron las lesiones más intensas con abundantes células epiteliales e inflamatorias mezcladas con bacterias en las criptas tonsilares.

La distribución del antígeno PV73 nos indica que la infección de este órgano se produce por vía sanguínea así, las primeras células inmunorreactivas a los 4 dpi fueron los monocitos circulantes y los macrófagos infectándose, a los 6 dpi escasas células reticulares de los folículos linfoides, lo que coincide con las observaciones apuntadas por otros autores en estudios con inmunofluorescencia (Boulanger y cols., 1967; Colgrove y cols., 1969, Mebus, 1987) e hibridación "in situ" (Galo y Nunes Petisca, 1990). En el animal muerto (7 dpi) y en los sacrificados a los 12 dpi aumentó considerablemente la inmunorreactividad específica (PV73) en el epitelio y en macrófagos los cuales se diferenciaron al utilizar un anticuerpo anti-queratina. En este sentido, Colgrove y cols. en 1969, han sido los únicos que indicaron inmunofluorescencia en algunas células epiteliales tonsilares en un animal recién nacido inoculado intranasalmente con un aislado virulento. Sin embargo, la mayoría de los autores (Boulanger y cols., 1967; Mebus, 1987; Mebus, 1988) destacan como característica diferencial de la Peste Porcina Clásica, el nulo tropismo del VPPA por las células epiteliales de las tonsilas (Mebus, 1988).

El mecanismo de infección de las células epiteliales por el VPPA, al igual que de otras estirpes celulares no macrofágicas, permanece aún sin aclarar, pero si parece evidente que los virus, principalmente los más virulentos, infectan células epiteliales lo que se demostró en el presente trabajo, así como en otros estudios inmunohistopatológicos y ultraestructurales (Sierra y cols., 1990b; Fernández y cols., 1992b). En estos estudios se evidenciaron antígenos del virus o cuerpos de inclusión en células del epitelio biliar y del epitelio tubular renal (Fernández y cols., 1992b; Hervás y cols., 1993). Un hecho interesante fue la observación de un mayor número de células epiteliales infectadas en el animal más lesionado (7 dpi) y en los sacrificados a los 12 dpi,

sin seroconversión, lo que concuerda con observaciones previas relacionadas con la aparición de antígenos del virus en células no macrofágicas en las fases finales de la enfermedad con virus virulentos (Fernández y cols., 1992a; Fernández y cols., 1992b). En cambio, a los 10 dpi, el número de células epiteliales infectadas fue muy escaso, lo que conjuntamente con la seroconversión de estos animales, hace difícil interpretar las diferencias con respecto a los resultados mencionados anteriormente.

Otra posible explicación de la presencia de virus en estas células vendría dada por la capacidad de captar sustancias de las células epiteliales de las criptas tonsilares (Williams y Rowland, 1972). Finalmente, la salida del virus desde las tonsilas a la luz de las criptas vehiculado en macrófagos, células epiteliales y restos celulares permitiría la eliminación del virus vía oronasal o la reinfección vía respiratoria y/o digestiva (Greig y Plowright, 1970; McVicar, 1984).

Las lesiones hepáticas observadas en nuestro trabajo con la utilización de un aislado moderadamente virulento (E75) se localizaron fundamentalmente en las células del SMF (monocitos, macrófagos intersticiales y células de Kupffer), y en hepatocitos y células epiteliales biliares en las fases más avanzadas de la enfermedad lo que concuerda con los cuadros lesionales hepáticos descritos en la PPA aguda y subaguda (Lucas y cols., 1970; Konno y cols., 1971b; Mebus y Dardiri, 1979; Sierra y cols., 1987; Fernández y cols., 1992a).

Las células primariamente infectadas fueron las células de Kupffer con signos de degeneración y conteniendo PV73 desde los 4 dpi lo que confirma su papel de célula blanco natural del VPPA (Colgrove y cols., 1979; Mebus, 1988) a donde llega por vía sanguínea, vehiculado principalmente por eritrocitos y monocitos circulantes (Heuschele, 1967; Colgrove y cols., 1969; Fernández y cols., 1992a).

Al igual que en nuestras observaciones otros autores resaltan la hiperplasia de las células de Kupffer con aislados de moderada virulencia produciéndose posteriormente la destrucción de estas células en las fases más avanzadas de la enfermedad (Mebus, 1988; Mebus y Dardiri, 1979; Fernández y cols., 1992a). Con la utilización de un aislado altamente virulento, se detectó la necrosis temprana de las células de Kupffer observándose posteriormente la necrosis e infección

de los hepatocitos (Fernández y cols., 1992; Pérez, 1992), como ha ocurrido en el presente estudio en las últimas fases de la enfermedad. Estos datos vuelven a confirmar que la infección de las células no macrofágicas depende de la patogenicidad del aislado empleándose ésta en las fases más avanzadas de la enfermedad (Sierra y cols., 1987; Gómez-Villamandos, 1988; Galo y Nunes Petisca, 1990; Fernández y cols., 1992a; Fernández y cols., 1992b), lo que cuestiona por otra parte, la especificidad única del VPPA por células de origen mieloide (Casal y cols., 1984) con un receptor viral específico (Alcamí y Viñuela, 1991). Este receptor media la entrada del virus en los macrófagos en los que se produce una infección productiva (Alcamí y Viñuela, 1991) que no ha sido demostrada hasta el momento en otros elementos celulares. En el animal muerto hemos observado escasas células del epitelio biliar conteniendo PV73, lo que confirma la idea expuesta anteriormente con respecto a la infección de células no macrofágicas en el hígado.

Al igual que en otros órganos se observaron algunos neutrófilos circulantes o infiltrados, con inmunorreacción difusa lo que concuerda con la infección y/o fagocitosis del virus de estas células descrita "in vitro" (Casal y cols., 1984) e "in vivo" en estudios inmunohistológicos (Fernández y cols., 1992a; Pérez, 1992) y ultraestructurales (Gómez-Villamandos, 1988).

Los cambios vasculares más significativos estuvieron representados por una congestión y un edema intersticial moderado a partir de los 4 dpi. Estas lesiones se intensificaron con el curso de la enfermedad siendo muy intensas en el animal muerto (7 dpi) y en los sacrificados a los 10 y 12 dpi, cuando se encontraron hemorragias intersticiales, dilatación de los sinusoides, y lagunas hemáticas (Mebus y Dardiri, 1979) asociadas a zonas de necrosis de hepatocitos (Lucas y cols., 1970; Konno y cols., 1971a). En nuestra experiencia no se observó inmunorreacción en las células endoteliales en contraposición a la observación hecha por otros autores con aislados más virulentos (Colgrove y cols., 1969; Fernández y cols., 1992a; Pérez, 1992). Estas lesiones se explicarían en base a la secuenciación de la infección inicialmente en macrófagos y posteriormente en hepatocitos (Fernández y cols., 1992a).

Las observaciones histopatológicas de los pulmones se corresponden con las hechas por otros autores (Carrasco, 1988; Sierra y cols., 1990a) siendo los monocito/ macrófagos intravasculares las células primariamente afectadas desde los 4 dpi (Carrasco, 1988; Sierra y

cols., 1990; Carrasco y cols., 1992). También desde este día postinfección se observó una hiper celularidad progresiva de células mononucleares en los septos interalveolares en donde se detectaron grandes cantidades de PV73, lo que justifica los títulos altos de virus encontrados en este órgano desde las primeras fases de la enfermedad (Heuschele, 1967; Plowright y cols., 1968; Ekue y cols., 1989).

En nuestros resultados y, en contraste con los descritos por otros autores utilizando la técnica de la hibridación "in situ" (Galo y Nunes Petisca, 1990), no hemos observado antígeno vírico en células epiteliales broncoalveolares, así como, al no presentarse macrófagos alveolares, tampoco se detectó antígeno en estas células (Fernández y cols., 1992a). Estas observaciones podrían explicarse por una parte, por el diferente comportamiento del virus cuando infecta las MIPs (Carrasco, 1988), los cuales no se destruirían tan rápidamente como otros macrófagos (Pan, 1987; Carrasco y cols., 1992) y, por otra, el retraso de la destrucción masiva de los MIPs en base a la diferencia de comportamiento, frenaría la aparición de macrófagos alveolares, la destrucción de éstos y probablemente, la infección de las células epiteliales broncoalveolares (Galo y Nunes Petisca, 1990; Pérez, 1992).

Esta hipótesis no se contradice con las observaciones del animal muerto a los 7 dpi, en el cual, el elevado número de macrófagos intravasculares activados participarían en los fenómenos de hipertensión vascular (Carrasco 1988; Winkler, 1989; Sierra y cols., 1990a) y liberación de productos vasoactivos causantes de desórdenes circulatorios (Bertram y cols., 1989) como el edema alveolar agudo que es característico de la PPA aguda (Pan, 1987; Sierra y cols., 1987).

Las lesiones renales macroscópicas más destacadas consistieron en hemorragias petequiales localizadas a nivel cortical y medular en las últimas fases de la enfermedad. Histológicamente y a nivel glomerular, los cambios más característicos consistieron en procesos de degeneración en monocitos y/o células mesangiales (Pan, 1987) y trastornos de la permeabilidad vascular a partir de los 6 dpi. En las últimas fases de la enfermedad y, especialmente en el animal muerto y en los sacrificados a los 10 dpi, se observaron abundantes restos celulares en circulación, microtrombosis y hemorragias multifocales y microtrombosis, lesiones renales descritas en la PPA aguda y subaguda (Quezada, 1988, Sierra y cols., 1989; Martín-Fernández y cols., 1991).



En los glómerulos se observó antígeno vírico mediante inmunofluorescencia (Colgrove y cols., 1969; Pan, 1987) e inmunoperoxidasa (Fernández y cols., 1992a) en escasos monocitos circulantes y en algunas células mesangiales, células que presentaron inmunorreacción (PV73) desde los 4 dpi. La infección de estas células en el glomérulo y de los macrófagos intersticiales vía sanguínea serían los responsables del aumento de la permeabilidad capilar en las primeras fases de la enfermedad. Posteriormente, tendríamos que diferenciar los mecanismos por los cuales aparecen las hemorragias renales. Por una parte, y en el animal muerto (7 dpi) el antígeno PV73 se localiza escasamente en los glomérulos con fenómenos de microtrombosis, en numerosos macrófagos y escasas células endoteliales del intersticio cortical y medular, confirma una CID asociada a la mayor del VPPA (E75), en esta experiencia, en relación a las observaciones de Fernández y cols., 1992. Por otra parte, los microtrombos encontrados en los animales sacrificados a los 10 dpi, constituidos por fibrina, plaquetas e IgM, constituye igualmente un indicativo morfológico de la CID (Quezada y cols., 1989; Sierra y cols., 1989) como mecanismo inductor de una coagulopatía de consumo y de hemorragias renales (Pan, 1987; Villeda y cols., 1993). La participación de IgM y plaquetas en los microtrombos sin antígeno PV73 ni C3 (datos no incluidos), cuestiona la participación de los inmunocomplejos en la CID (Slauson y Sánchez-Vizcaíno, 1981).

Finalmente, algunos autores han descrito antígeno vírico y/o cuerpos de inclusión (Hervás y cols., 1993) en el epitelio tubular utilizando aislados virulentos (Pan, 1987; Fernández y cols., 1992a); en nuestros resultados hemos observado escasas células epiteliales inmunorreactivas (PV73) en las fases tardías de la infección lo que confirma la secuencia de infección del virus en cualquier órgano (Fernández y cols., 1992b). La entrada del VPPA en estas células producida bien por reabsorción después de la lesión glomerular (Fernández y cols., 1992a; Hervás y cols., 1993) o vía tejido intersticial peritubular, después de la destrucción de los macrófagos próximos a las membranas basales de las células epiteliales tubulares. En el riñón hemos de concluir que aunque es un órgano con lesiones anatomopatológicas hemorrágicas muy características de la enfermedad, presenta una menor importancia en el diagnóstico inmunohistológico y/o virológico de la PPA con respecto a los otros órganos estudiados (Plowright y cols., 1968; Bool y cols., 1969; Dardiri y Hess, 1970; Coggins, 1974).

### **VI.3. Mecanismos Patogénicos de las Hemorragias en la PPA.**

Los virus que causan fiebres hemorrágicas poseen tropismo por células con importantes funciones hemostáticas como son los hepatocitos, las células endoteliales, los monocito/macrófagos y los megacariocitos (Halstead y cols., 1978; Oldstone y cols., 1982).

Una de las principales características lesionales de la PPA es la presentación de hemorragias en diferentes órganos (DeKock y cols., 1940; Sánchez-Vizcaíno, 1992; Jubb y cols., 1993) lo que ha llevado a distintos investigadores a estudiar los mecanismos fisiopatológicos que conducen a la aparición de las mismas (Edwards y cols., 1985; Anderson y cols., 1987; Villeda y cols., 1993). Son varios los mecanismos que conducen a la aparición de las hemorragias en cerdos infectados con el VPPA y dependientes, en gran medida, de la virulencia del aislado (Edwards y cols., 1984; Anderson, 1986, Villeda y cols., 1993).

Los cerdos muertos de PPA aguda y subaguda presentan extensas hemorragias y, en la mayoría de los casos, es común la presencia de trombocitopenia (Edwards y cols., 1985a) con tiempos alargados de hemorragia (Neser y Kotzé, 1987); en nuestros resultados los animales presentaron hemorragias en diferentes órganos siendo más manifiestas desde los 8 dpi con una disminución progresiva del número de plaquetas desde los 2 dpi y una trombocitopenia marcada en los sacrificados a los 10 dpi, animales en los que se observó lesiones de CID, asociada a títulos altos de virus y anticuerpos, lo que se corresponde con los trabajos de Pan y cols. quienes incluyen fenómenos directos e indirectos (inmunológicos) como causa de los animales infectados con el UPPA en sus formas agudas y subagudas.

Uno de los posibles mecanismos inductores de trombocitopenia es la infección de los megacariocitos. Con aislados virales de moderada virulencia se ha observado la infección del 2 al 10% de los megacariocitos de la médula ósea a los 7 dpi (Edwards y cols., 1985a; Edwards y cols., 1985b) sin embargo, estos autores no consideraron el bloqueo de la trombocitopoyesis por la infección vírica como un mecanismo determinante de la trombocitopenia en la PPA. Nuestros resultados indican la infección de los megacariocitos desde los 6 dpi desapareciendo un alto porcentaje de ellos en el animal muerto. Un 25-30% de los megacariocitos aparecían con signos degenerativos y conteniendo PV73, lo que confiere una mayor importancia a la acción

directa del virus sobre los precursores plaquetarios en la inducción de la trombocitopenia al contrario de lo descrito por otros autores (Edwards y cols., 1985b).

En cerdos infectados con UPPA Edwards y cols. en 1985 encontraron a los 13 dpi, un retorno de las plaquetas a los niveles normales paralelamente con una hiperplasia de los megacariocitos que coexistían con una viremia alta. De igual forma y a los 12 dpi nosotros hemos observado una hiperplasia de megacariocitos manteniéndose el 25-30% inmunorreactivos para la PV73 junto a un considerable número de estas células con características normales a la vez que se detectó una elevación de plaquetas en sangre. Estas observaciones sostienen la idea de un importante tropismo del virus E75 por los megacariocitos en las fases intermedias y finales de la enfermedad, pero siempre asociada a una marcada destrucción del SMF.

Como segundo mecanismo inductor de trombocitopenia en la PPA se ha sugerido la infección de las plaquetas, así entre un 1 y un 20% de las mismas presentaron alteraciones ultraestructurales e imágenes indicativas de replicación vírica en cerdos infectados con cepas moderadamente virulentas (Neser y cols., 1986). En nuestro trabajo, no hemos podido visualizar antígeno vírico en estas células si bien, y considerando la necesidad de la actividad del núcleo celular para la replicación del VPPA (Ortín y Viñuela, 1977), los cambios ultraestructurales observados en las plaquetas podrían estar producidos desde su fraccionamiento en los megacariocitos infectado o se deberían a fenómenos independientes de la acción directa del virus sobre las mismas ya que el número de plaquetas conteniendo virus (E75) es muy escaso (Sierra, comunicación personal).

La alta liberación de ácido araquidónico y la producción de metabolitos tras la destrucción por el virus de las células del SMF (Maurer y cols., 1958; Colgrove y cols., 1969) aumentan la permeabilidad vascular e induce la agregación plaquetaria (Anderson, 1986; Anderson y cols., 1987; Villeda y cols., 1993) lo que podría explicar la inicial disminución de los trombocitos sanguíneos así como su colaboración en la trombocitopenia con la que algunos animales mueren (Anderson y cols., 1987).

Otro de los mecanismos que conduce a una trombocitopenia es el consumo periférico de plaquetas en el transcurso de una Coagulación Intravascular Diseminada (CID) (Pan, 1987), en las últimas fases de la enfermedad y cuya representación morfológica la hemos observado

especialmente, en riñón y pulmón. Los microtrombos característicos de este fenómeno están constituidos principalmente por fibrina polimerizada, cuya participación ha sido apuntada por otros autores (Pan y cols., 1975; Quezada, 1988; Martín-Fernández y cols., 1991), la cual atrapa plaquetas que pueden ser detectadas microscópicamente mediante el suero anti-factor VIII de la coagulación, lo que ha sido demostrado en las últimas fases de la enfermedad de nuestro trabajo en forma granular y/o puntiforme, corroborando la presencia de las mismas en los microtrombos glomerulares.

En algunas enfermedades como la Anemia Infecciosa Equina (Clabough, 1990), Moquillo Canino (Axthelm y Krakowka, 1987) y en la Diarrea Vérica Bovina (Corapi y cols., 1990), se han observado inmunocomplejos asociados a la superficie de las plaquetas lo que induciría su destrucción por agregación por activación del complemento y/o después de su fagocitosis por el SMF. En la PPA se ha demostrado una trombocitopenia inmunomediada en animales infectados con virus moderadamente virulentos (Edwards y cols., 1985c), el progresivo aumento de la viremia y de los anticuerpos anti-VPPA a partir de los 6 dpi, conjuntamente con la disminución progresiva del número de plaquetas que llega a su mínimo a los 10 dpi, podría indicar que en este dpi se produce una relación crítica de equivalencia entre el antígeno vírico y los anticuerpos durante la infección, fenómeno que se considera importante para el desarrollo de una trombocitopenia inmunomediada (Edwards y cols., 1985c). Aunque no hemos podido visualizar los inmunocomplejos en las plaquetas, tampoco en suero rico en plaquetas (datos no introducidos en la tesis), la detección simultánea de PV73 e IgM en los megacariocitos, el aumento del antígeno vírico intracelular después de la elución, la viremia y los títulos de IgM, IgG e IgA en los animales trombocitopénicos sacrificados a los 10 dpi apoyarían la afirmación de que estos datos inmunohistológicos representan fenómenos inmunopatológicos relacionados con la trombocitopenia y la CID que acontece en la PPA (Pan y cols., 1975; Edwards y cols., 1985c; Fernández y cols., 1992c).

Otro de los mecanismos que predispone a la aparición de hemorragias es la reducción de los factores de la coagulación bien por una disminución en su síntesis o por un consumo a través de una CID (Oldstone y cols., 1982; Edwards y cols., 1985b; Villeda y cols., 1993). El hígado es el órgano donde se sintetizan la mayoría de los factores de la coagulación (Villeda y cols., 1993); las lesiones hepáticas ocurridas en el curso de la PPA aguda (Gómez-Villamandos, 1988;

Jubb y cols., 1993; Sierra y cols., 1993) así como los resultados inmunohistológicos (Colgrove y cols., 1969; Fernández y cols., 1992b) y ultraestructurales (Sierra y cols., 1987; Gomez Villamandos, 1988) en los que se ha demostrado la destrucción de hepatocitos, hecho también descrito en nuestro trabajo, puede explicar la disminución de la síntesis de factores de la coagulación en las fases más críticas de la enfermedad si bien, según los resultados fisiopatológicos, esta lesión no parece ser determinante en el desarrollo final de la enfermedad hemorrágica (Villeda y cols., 1993).

La activación y consumo de los factores de la coagulación ha sido demostrada tanto por la vía intrínseca como extrínseca, predominando una u otra según la virulencia del aislado vírico (Villeda y cols., 1993). La inmunorreacción observada en el animal muerto (7 dpi) y a partir de los 8 dpi en algunas células endoteliales del riñón coincide con distintos estudios inmunohistológicos (Colgrove y cols., 1969; Pan, 1987; Fernández y cols., 1992a) y ultraestructurales (Quezada, 1988; Sierra y cols., 1989) realizados "in vivo" con aislados virulentos y con los observados "in vitro" (Wilkinson y Wardley, 1978) en los que se demostró la infección de las células endoteliales por el VPPA, lo que explicaría su participación en la activación de la vía intrínseca de la coagulación (Honor, 1991; Villeda y cols., 1993). El escaso número de células endoteliales infectadas, hace que la lesión directa del virus no se considere como uno de los mecanismos importantes de las hemorragias en la PPA (Fernández y cols., 1992a).

Por otra parte, la tumefacción endotelial y la lesiones vasculares observadas en algunos órganos en las últimas fases de la enfermedad, darían lugar a la exposición de las estructuras subendoteliales lo que, unido a la liberación de factores procoagulantes por los macrófagos activados y/o destruidos (Anderson y cols., 1987; Pan, 1987), activa la vía extrínseca de la coagulación la cual, parece tener una mayor importancia en el desarrollo de la CID con aislados moderadamente virulentos (Edwards y cols., 1984; Villeda y cols., 1993). Finalmente, la alteración de los monocito/ macrófagos por la infección del virus observada desde el principio de la enfermedad, disminuye la capacidad de fagocitosis y por tanto la eliminación de la sangre de factores de la coagulación activados, favoreciendo el desarrollo de la CID (Morgensen, 1979).

En la PPA subaguda y crónica, se ha comprobado que la respuesta inmune desarrollada,

en nuestro caso desde los 6 dpi, da lugar a la formación de anticuerpo fijadores del complemento (Norley y Wardley, 1982) y mediadores de citotoxicidad (Norley y Wardley, 1983b) que participan en los fenómenos de quimiotaxis leucocitaria y permeabilización vascular (Slauson y Sánchez-Vizcaíno, 1981; Bielefeldt Ohmann y Babink, 1986). En estas formas de la enfermedad, también se han observado depósitos de inmunocomplejos (VPPA-IgG-C3) en las membranas basales y mesangiales del riñón (Pan y cols., 1975; Slauson y Sánchez-Vizcaíno, 1981; Martín-Fernández y cols., 1991). Este hecho no ha podido demostrarse de forma completa en nuestro estudio, ya que si bien se detectaron inmunoglobulinas en las membranas basales glomerulares a partir de los 8 dpi, no se observó C3 ni C1q (datos no incluidos en el presente trabajo). Tampoco se evidenció complemento en los microtrombos de los cerdos a los 10 dpi. Estos resultados podrían explicarse en base a que, si bien se forman uniones antígeno-anticuerpo en las fases de coexistencia de viremia y gammaglobulinemia anti-virus, la presencia de anticuerpos fijadores y activadores del complemento no se produce hasta los 14 dpi (Norley y Wardley, 1982; Norley y Wardley, 1985).

Por otra parte, la existencia de inmunocomplejos establece la posibilidad de la entrada del virus en las células a través de los receptores Fc y del complemento (Fernández y cols., 1992c); aunque la entrada de inmunocomplejos en los macrófagos parece no desarrollar una infección productiva (Alcamí y Viñuela, 1991), hemos de tener en cuenta la presencia de antígeno PV73 e inmunoglobulinas en numerosas células macrofágicas, lo que representa la presencia de inmunocomplejos puesta de manifiesto además después de la elución. Este fenómeno debería recibir mayor atención, ya que posibilita entradas alternativas en las células blanco, hecho que ha sido demostrado en otras enfermedades víricas hemorrágicas (Halstead y cols., 1978).

## VII. CONCLUSIONES

1.- El anticuerpo monoclonal 18B.G3, dirigido contra la proteína PV73 del VPPA, puede ser utilizado en técnicas inmunohistológicas, inmunoperoxidasa (ABC) e inmunofosfatasa alcalina (Strp FA), sobre tejidos fijados en formol. Los pretratamientos de desenmascaramiento antigénico con pronasa y, de elución de anticuerpos en las últimas fases de la enfermedad, aumentan la cantidad de antígeno vírico presente en los tejidos infectados.

2.- La PV73 se detectó primariamente (2-4 dpi) en las células con alta capacidad de fagocitosis y pertenecientes al SMF.

3.- En las fases intermedias de la enfermedad (6-8 dpi), la PV73 se detectó en el SMF y en megacariocitos (25-30%) de la médula ósea, algunos neutrófilos y escasos hepatocitos.

4.- En las fases finales de la enfermedad (7 dpi\*, 10 y 12 dpi), previa a la destrucción masiva del SMF, la PV73 se detectó en un mayor número de hepatocitos, megacariocitos, escasas células endoteliales y en el epitelio de los túbulos renales, canáliculos biliares y criptas tonsilares, en este último caso en un elevado número.

5.- La evolución de las lesiones hemorrágicas en los órganos estudiados está directamente relacionada con la progresión de la infección celular (PV73), la viremia y la trombocitopenia.

---



6.- La distribución de la PV73 y de las inmunoglobulinas (IgM, IgG e IgA), así como la viremia y los anticuerpos anti-VPPA en sangre en los animales sacrificados a los 10 dpi, parecen indicar la participación de fenómenos inmunomediados en el desarrollo de la enfermedad.

7.- Las lesiones hemorrágicas del animal muerto a los 7 dpi y de los sacrificados a los 12 dpi, sin seroconversión, confirman la participación en las mismas de distintos mecanismos dependiente, principalmente, del aislado vírico y de su interacción con células pertenecientes y no pertenecientes al SMF.

## VIII. RESUMEN

En el presente trabajo estudiamos las características histopatológicas e inmunohistológicas de la Peste Porcina Africana (PPA) producida por un aislado vírico moderadamente virulento (España 75).

Como animales de experimentación hemos utilizado 12 cerdos de raza miniatura y de aproximadamente 3 meses de edad a los que se les inoculó vía intramuscular una dosis de  $10^5$  HAD<sub>50</sub> del virus de la PPA (VPPA). Los animales fueron divididos en seis lotes de dos cerdos cada uno y se sacrificaron secuencialmente los días 2, 4, 6, 8, 10 y 12 postinfección; uno de los animales del lote IV apareció muerto a los 7 dpi mostrando un cuadro lesional característico de PPA aguda.

Para la detección de la proteína vírica PV73 del VPPA se utilizó un anticuerpo monoclonal (18B.G3) sobre cortes histológicos que tuvieron que ser sometidos a digestión con pronasa y/o elución con la finalidad de demostrar la PV73 bien por estar enmascarada tras la fijación e inclusión, o bloqueo por inmunoglobulinas específicas anti-VPPA.

Las técnicas inmunohistoquímicas empleadas fueron las de inmunoperoxidasa y la inmunofosfatasa alcalina detectándose la PV73 en todos los órganos estudiados, bien de forma única globular intracitoplasmática, correspondiente a cuerpos de inclusión, o bien de forma

granular múltiple o difusa en el citoplasma.

Hemos observado antígeno vírico PV73 en primer lugar en monocitos circulantes y macrófagos de los senos subcapsulares de los ganglios linfáticos, pulpa esplénica roja, médula ósea y en el estroma de las tonsilas. Desde los 4 dpi hemos detectado igualmente la PV73 en monocitos circulantes, células de Kupffer y macrófagos intersticiales hepáticos, macrófagos septales e intersticiales pulmonares y en monocitos, células mesangiales y macrófagos intersticiales renales. En las fases intermedias y finales de la enfermedad y, coincidiendo con una masiva destrucción de las células macrofágicas, se observó la PV73 en células no pertenecientes al Sistema Mononuclear Fagocítico (SMF) como neutrófilos, megacariocitos, células endoteliales de capilares renales, hepatocitos, epitelio biliar, tonsilar y de los túbulos renales. Estas observaciones indican el tropismo primario del virus por el SMF y secundariamente, en las fases más avanzadas de la enfermedad, por las células no pertenecientes a este sistema, participando todas ellas en la evolución de las lesiones propias de la PPA aguda y subaguda.

La marcada destrucción y presencia de PV73 en los megacariocitos (25-30%), atribuye a la infección directa por el VPPA un papel importante en la disminución de plaquetas en la sangre. Además, la presencia de inmunoglobulinas en megacariocitos infectados, la trombocitopenia, viremia, anticuerpos circulantes y lesiones de los animales sacrificados a los 10 dpi, parecen indicar la coparticipación de fenómenos inmunomediados y de la CID en estos animales.

Por otra parte, estos resultados (10 dpi), contrastan con los del animal muerto a los 7 dpi y los sacrificados a los 12 dpi, los cuales mostraron lesiones similares y/o evolutivas pero no relacionadas con una alta concentración de anticuerpos en sangre, lo que permite establecer que en el desarrollo clínico-lesional conducente a la muerte con hemorragias de estos animales participarían distintos mecanismos dependientes del aislado viral y de su interacción con las células pertenecientes y no pertenecientes al SMF.

## IX. SUMMARY

In this work we have analysed the histopathologic and immunohistochemical features of experimental African swine fever (ASF) using the España 75 (E75) moderately virulent strain of the virus. Twelve three-month-old miniature pigs weighing 12 Kilos were inoculated with  $10^5$ HAD<sub>50</sub> of the virus by the intramuscular via, and were sacrificed at 2, 4, 6, 8, 10 and 12 days postinoculation (dpi). One of the pigs scheduled for sacrifice at 8 dpi was found dead at 7 dpi with a typical picture of acute ASF.

A monoclonal antibody raised against virus protein 73 (18B.G3) was used to analyze the tissue distribution pattern of viral antigens. Predigestion of tissue sections with pronase and elution techniques were employed in order to unmask antigens damaged by fixation or blocked by immunoglobulins, respectively. Two different immunohistochemical techniques were applied, immunoperoxidase and immuno alkaline phosphatase, and reactive products were always found in the cytoplasm as either globular (inclusion body-like) or granular/ diffuse staining.

VP73 has been detected in circulating monocytes and tissue macrophages of different organs: lymph nodes (subcapsular sinus), spleen (red pulp), bone marrow, and tonsils. From 4 dpi on, VP73 has been additionally found in the liver (circulating monocytes, Kupffer cells and interstitial macrophages), lung (septal and interstitial macrophages) and kidney (circulating monocytes, mesangial cells and interstitial macrophages). During the mid-stages of the disease,

---

when monocytes and macrophages had been widely destroyed, VP73 was additionally found in non-Mononuclear Phagocyte System (MPS) cells such as polymorphonuclear leukocytes, megakaryocytes, endothelial cells (renal capillaries only), hepatocytes, biliary epithelium cells, tonsillar epithelial cells, and renal tubular cells. These findings indicate the virus primary tropism for MPS cells shifts to non-MPS cells in advanced stages of the disease.

The severe destruction of megakaryocytes coupled with the presence of VP73 (25-30%) indicates that direct infection by the virus has an important role in the low blood platelet counts observed in ASF. In addition, data such as the finding of immunoglobulins in infected megakaryocytes, thrombocytopenia, viremia, circulating antibodies and the lesions of those pigs sacrificed at 10 dpi all suggest that both immunomediated and disseminated intravascular coagulation phenomena are both implied in the disease.

However, the lesions of both the pig found dead at 7 dpi and the ones sacrificed at 12 dpi, which were closely similar, were not related to the high serum antibody titers, which may indicate that different mechanisms depending on both the virus isolate and its interaction with MPS and non-MPS cells may be involved in the development of the clinico-pathologic picture conducting to the bleeding death of the animals.

## X. AGRADECIMIENTOS



Al Prof. Dr. Antonio Fernández Rodríguez, director de esta tesis, por sus enseñanzas, apoyo constante y confianza puesta en mí durante estos años.

A la Prof. Dra. Juana Martín de las Mulas González-Albo, directora de esta tesis, por la formación científica e interés mostrado en todo momento.

Al Prof. Dr. D. Amador Jover Moyano por los medios puestos a nuestra disposición para la realización de este trabajo.

A los componentes de la Unidad Docente de Histología y Anatomía Patológica de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Córdoba sin cuya inestimable colaboración no hubiese sido posible la realización de esta tesis.

A los compañeros y amigos del Departamento de Morfología de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria por su entusiasmo y disponibilidad.

Al Departamento de Virología del INIA de Madrid por la colaboración en la realización de la experiencia y por las determinaciones serológicas y virológicas amablemente realizadas.

---

## XI. BIBLIOGRAFÍA

- Addinger, H.K., Stone, S.S., Hess, W.R. and Bachrach, H.L. (1966). Extraction of infectious deoxyribonucleic acid from ASFV. *Virology* 30: 750-752.
- Agüero, M., Blasco, R., Wilkinson, P. and Viñuela, E. (1990). Analysis of naturally occurring deletion variants of African swine fever virus: Multigene family 110 is not essential for infectivity or virulence in pigs. *Virology* 176: 195-204.
- Alcamí, A., Carrascosa, A.L. and Viñuela, E. (1989). Saturable binding sites mediate the entry of African swine fever virus into VERO cells. *Virology* 168: 393-398.
- Alcamí, A. and Viñuela, E. (1991). Fc receptors do not mediate African swine fever virus replication in macrophages. *Virology* 181: 756-759.
- Alcaraz, C., Álvarez, A. and Escribano, J.M. (1992). Flow cytometric analysis of African swine fever virus induced-plasma membrane proteins and their humoral immune response in infected pigs. *Virology* 189: 266-273.
- Alcaraz, C., Pasamontes, B., Ruiz Gonzalvo, F. and Escribano, J.M. (1989). African swine fever virus-induced proteins on the plasma membranes of infected cells. *Virology* 168: 406-408.
- Allan, G.M., McNulty, M.S., Bryson, D.G., Mackie, D., Platten, M. (1989). Demonstration of bovine virus diarrhoea in formalin fixed paraffin embedded tissue using a streptavidin/ biotin technique. *Res. Vet. Sci.* 46: 416-418.
- Almendral, J.M., Blasco, R., Ley, V., Beloso, A., Talavera, A. and Viñuela, E. (1984). Restriction site map of African swine fever virus DNA. *Virology* 133: 258-270.
- Almendral, J.M., Talavera, A. and Viñuela, E. (1985). Cloning and mapping of African swine fever virus DNA. In: *Recombinant DNA Research and virus*. Ed. Y. Becker: 89-102.
- Almendral, J.M., Almazan, F., Blasco, R. and Viñuela, E. (1990). Multigene families in African swine fever virus family 110. *J. Virol.* 64: 2072.
- Alonso, F. (1987). Cell mediated immunity involved in African swine fever protection. *African swine fever and pig Immunology*. Salamanca, Noviembre.
- Alves de Matos, A.P., Marçal, M.R., Moura Nunes, J.F., Castro Portugal, F.L. e Vigarão, J.D. (1980a). Aspectos ultrastruturais e citoquímicos da maturação do vírus da Peste suína africana (PSA). *Rep. Trab. I.N.V.* XII: 79-84.

- Alves de Matos, A.P., Moura Nunes, J.F., Vigarío, J.E. e Castro Portugal, F.L. (1980b). Aspectos ultraestruturais da morfogénese e libertação do vírus da Peste suína africana (PSA) em células CV1. Rep. Trab. I.N.V. XII: 71-78.
- Alves de Matos, A.P., Vigarío, J.D., García e Costa, F., Castro Portugal, F.L. and Ferreira, C.A. (1981). Electron microscopy in African swine fever (ASF) diagnosis. Rep. Trab. I.N.V. XIII: 21-26.
- Almeida, J.C, Waterson, A.P. and Plowright, W. (1967). The morphological characteristics of African swine fever virus and its resemblance to Tipula iridescent virus. Arch. Ges. Virusforsch. 20: 392-396.
- Anderson, E.C. (1986). African swine fever: current concepts on its pathogenesis and immunology. Rev. Sci. Off. Int. Epiz. 5(2): 477-486.
- Anderson, E.C., Williams, S.M., Fisher-Hoch, S.P. and Wilkinson, P.J. (1987). Arachidonic acid metabolites in the pathophysiology of thrombocytopenia and haemorrhage in acute African swine fever. Res. Vet. Sci. 42: 387-394.
- Arias, M., Escribano, J.M., Rueda, A. y Sánchez-Vizcaíno, J.M. (1986). La Peste porcina africana. Med. Vet. 3: 333-355.
- Arias, M., Escribano, J.M. and Sánchez-Vizcaíno, J.M. (1993). Persistence of African Swine Fever antibody reactivity on ELISA and immunoblotting assays. Vet. Rec. 21: 189-190.
- Atwal, O.S., Minhas, K.J., Ferenczy, B.G., Jassal, D.S., Milton, D. and Mahadevappa, V.G. (1989). Morphology of pulmonary intravascular macrophages (PIMs) in ruminants: Ultrastructural and cytochemical behavior of dense surface coat. Am. J. Anat. 186: 285-299.
- Axthelm, M.K. and Krakowka, S. (1987). Canine distemper virus-induced thrombocytopenia. Am. J. Vet. Res. 48(8): 1269-1275.
- Battifora, H. (1991). Assessment of antigen damage in immunohistochemistry. The vimentin internal control. Am. J. Clin. Pathol. 96: 669-671.
- Battifora, H. and Koipinski, M. (1986). The influence of protease digestion and duration of fixation on the immunostaining of keratins. A comparison of formalin and ethanol fixation. J. Histochem. Cytochem. 34: 1095-1100.
- Bertram, T.A. (1986). Intravascular macrophages in lungs of pigs infected with *Haemophilus pleuropneumoniae*. Vet. Pathol. 23: 681-691.
- Bertram, T.A., Eling, T.E. and Brody, A.R. (1989). Arachidonic acid metabolism in isolated cells. In: The pulmonary intravascular macrophages. Norman C. Staub. Ed. Futura Publishing Company. New York. pp. 101-121.
- Bielefeldt Ohmann, H. and Babink, L.A. (1986). Viral infection in domestic animals as models for studies of viral immunology and pathogenesis. J. Gen. Virol. 66: 1-25.
- Black, D.N. and Brown, F. (1976). Purification and physicochemical characteristics of African swine fever virus. J. Gen. Virol. 32: 509-518.
- Blasco, R., Agüero, M., Almendral, J. and Viñuela, E. (1989a). Variable and constant regions in African swine fever virus DNA. Virology 168: 330-338.
- Blasco, R., De la Vega, I., Almazan, F., Agüero, M. and Viñuela, E. (1989b). Genetic variation of African swine fever virus: variable regions near the end of the viral DNA. Virology 173: 251-257.
- Bool, P.H., Ordás, A. y Sánchez Botija, C. (1969). El diagnóstico de la Peste Porcina Africana por inmunofluorescencia. Bull. Off. Int. Epiz. 72: 819-839.
- Boulanger, P., Banister, G.L., Greig, A.S. and Ruckerbauer, G.M. (1966). Diagnosis of African swine fever by immunofluorescence and other serological methods. Bull. Off. Int. Epiz. 66: 1.
- Boulanger, P., Bannister, G.L., Greig, A.S., Gray, D.P., Ruckerbauer, G.M. and Willis, N.G. (1967). African swine

- fever IV. Demonstration of the viral antigen by means of immunofluorescence. Can. J. Comp. Med. Vet. Sci. 31: 16-23
- Bournsnel, M., Shaw, K., Yáñez, R.J., Viñuela, E. and Dixon, L. (1991). The sequences of the ribonucleotide reductase genes from African swine fever virus show considerable homology with those of the Orthopoxvirus, Vaccinia virus. Virology 184: 411-416.
- Brandtzaeg, P. (1982). Tissue preparation methods for immunocytochemistry. In: Techniques in immunocytochemistry. Ed. G.R. Bullock, Academic Press, London-New York. pp. 1-76.
- Brandtzaeg, P. and Rognum, T.O. (1984). Evaluation of nine different fixatives 2. Preservation of IgG, IgA and secretory component in an artificial immunohistochemical test substrate. Histochem. 81: 213-219.
- Breese, S.S. and DeBoer, C.J. (1966a). Electron microscopy observations of African swine fever virus in tissue culture cells. Virology 28: 420-428.
- Breese, S.S. and DeBoer, C.J. (1967). Chemical structure of African swine fever virus investigated by electron microscopy. J. Gen. Virol. 1: 251-252.
- Breese, S.S. and Hess, W.R. (1966b). Electron microscopy of African swine fever virus hemadsorption. J. Bacteriol. 92(1): 272-274.
- Brown, F. (1986). The classification and nomenclature of viruses: summary of results of meetings of the International Committee on Taxonomy of viruses in Sendai, September 1984. Intervirology 25: 141-143.
- Bussoleti, G. and Gugliotta, P. (1983). Nonspecific staining of mast cells by avidin-biotin-peroxidase complex. J. Histochem. Cytochem. 31: 1419-1421.
- Camacho, A. and Viñuela, E. (1991). Protein p22 of African swine fever virus. An early structural protein that is incorporated into the membrane of infected cells. Virology 181: 251-257.
- Campbell, A.M. (1985). Monoclonal antibody technology. In: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Ed. Elsevier. Amsterdam. Chapter 1. pp. 1-31.
- Canals, A., Alonso, F., Tomillo, J. and Domínguez, J. (1992). Analysis of T lymphocyte subsets proliferating in response to infective and UV-inactivated African swine fever viruses. Vet. Microb. 33: 117-127.
- Carrasco, L. (1988). Estudio morfológico de las lesiones del sistema mononuclear fagocítico del pulmón en cerdos afectados de peste porcina africana experimental. Tesis Doctoral. Fac. Vet. Córdoba. Dpto. Anat. y Anat. Pat. Comp.
- Carrasco, L., Fernández, A., Gómez Villamandos, J.C., Mozos, E., Méndez, A. and Jover, A. (1992). Kupffer cells and PIMs in acute experimental African swine fever. Histol. Histopathol. 7: 421-425.
- Carrascosa, J.L., Carazo, J.M., Carrascosa, A.L., García, N., Santisteban, A. and Viñuela, E. (1984). General Morphology and Capsid Fine Structure of African Swine Fever Virus Particles. Virology 132: 160-172.
- Carrascosa, J.L., González, P., Carrascosa, A.L., García-Barreno, B., Enjuanes, L. and Viñuela, E. (1986). Localization of structural proteins in African Swine Fever Virus Particles by immunoelectron microscopy. J. Virol. 58(2): 377-384.
- Carrascosa, A.L., Kuznar, J., Ortín, J. and Viñuela, E. (1978). Structural and non-structural proteins of ASFV. Abstr. paper press. 4th. Int. Cong. Virol. The Hague. 546.
- Carrascosa, A.L., Del Val, M., Santarén, J.F. and Viñuela, E. (1985). Purification and properties of African swine fever (ASF) virus. J. Virol. 54: 337-344.
- Carrascosa, A.L., Santarén, J.F. and Viñuela, E. (1982). Production and titration of African swine fever virus in porcine

- alveolar macrophages. J. Virol. Meth. 3: 303-310.
- Carrascosa, A.L., Sastre, I., González, P. and Viñuela, E. (1993). Localization of the African swine fever virus attachment protein p12 in virus particle by immunoelectron microscopy. Virology 193: 460-465.
- Carvalho, Z.G., Alves De Matos, A.P. and Rodrigues-Pousada, C. (1988). Association of African swine fever virus with the cytoskeleton. Virus Res. 11: 175-192.
- Casal, I., Enjuanes, L. and Viñuela, E. (1984). Porcine leukocyte cellular subsets sensitive to African Swine Fever Virus in vitro. J. Virol. 52(1): 37-46.
- Casal, I., Viñuela, E. and Enjuanes, L. (1987). Synthesis of African swine fever (ASF) virus-specific antibodies in vitro in a porcine leucocyte system. Immunology 62: 207-213.
- Castagnoli, B. (1969). Diagnosi differenziale clinica ed anatomopatologica fra peste suina africana e classica. Atti Soc. Ital. Sci. Vet. XXIII: 955-958.
- Castagnoli, B., Ravaioli, L. ed Orfei, Z. (1967). Caratteristiche epizootologiche, cliniche ed anatomo- patologiche dei primi focolai di Peste suina africana in Italia. Atti Soc. Ital. Sci. Vet. 21: 904-908.
- Castro Portugal, F.L., Moura Nunes, J.F., Alves de Matos, A.P., Vigario, J.E. and Ferreira, C.A. (1976). Detection of African swine fever antigens in cell cultures by the immunoperoxidase technique in light and electron microscopy. Agric. Res. Semin. Hog Cholera/Classical swine fever and African swine fever. Hannover. EUR 5904: 635-641.
- Chem, K., Demetris, J., VanThiel, D.H. and Whiteside, T.L. (1987). Double immunoenzyme staining methods for analysis of tissue and blood lymphocyte subsets with monoclonal antibodies. Lab. Invest. 56: 114-119.
- Clabough, D.L. (1990). The immunopathogenesis and control of equine infectious anemia. Vet. Med. Equine Practice 1020-1028.
- Clarck, W.F., Reid, B.D., Dennis, B.N. and Burka, J.F. (1980). Inhibition of platelet aggregation and release in a forming immune complex system. Throm. Res. 19: 687-693.
- Coggins, L. (1968a). A modified hemadsorption-inhibition test for African swine fever virus. Bull. Epiz. Dis. Afr. 16: 61-64.
- Coggins, L. (1968b). Segregation of a nonhemadsorbing African swine fever virus in tissue culture. Cornell Vet. 58: 12-20.
- Coggins, L. (1974). African swine fever virus. Pathogenesis. Progr. Med. Virol. 18: 48-63.
- Coggins, L. and Heuschele, W.P. (1966). Use of agar diffusion precipitation test in the diagnosis of African swine fever. Am. J. Vet. Res. 27: 485-488.
- Coggins, L., Moulton, J.E. and Colgrove, G.S. (1967). Studies with hind attenuated African swine fever virus. East Afr. Vet. Res. Org.: 526-540.
- Colgrove, G.S. (1968). Immunofluorescence and inclusion bodies in circulating leukocytes of pigs infected with African swine fever virus. Bull. Epiz. Dis. Afr. 16: 341-343.
- Colgrove, G.S., Haelterman, E.D. and Coggins, L. (1969). Pathogenesis of African swine fever in young pigs. Am. J. Vet. Res. 30: 1343-1359.
- Contini, A., Cossu, P., Rutili, D. and Firinu, A. (1982). African swine fever in Sardinia. In: P.J. Wilkinson (Ed.) African Swine Fever, EUR 8466 EN, Proc. CEC/FAO Research Seminar, Sardinia, September 1981. pp. 1-6.
- Coppe, Ph. (1988). Les anticorps monoclonaux en diagnostic vétérinaire. Ann. Méd. Vét. 132: 243-250.

- Corapi, W.V., Elliot, R.D., Frech, T.W., Arthur, D.G., Bezek, D.M. and Dubovi, E.J. (1990). Thrombocytopenia and hemorrhages in veal calves infected with bovine viral diarrhoea virus. J. Am. Vet. Med. Assoc. 196(4): 590-596.
- Cowan, K.M. (1963). Immunologic studies on African swine fever virus II. Enhancing effect of normal bovine serum on the Complement-fixation reaction. Am. J. Vet. Res. 24(101): 756-761.
- Dardiri, A.H. and Hess, W.R. (1970). Pathogenesis of African swine fever in pigs. Proc. 74th annu. Meet U.S. Anim. Health Assoc. 213-224.
- DeBoer, C.J. (1967). Studies to determine neutralizing antibody in sera from animals recovered from African swine fever and laboratory animals inoculated with African virus vaccine with adjuvants. Arch. Ges. Virusforsch. 20: 164-179.
- DeBoer, C.J., Hess, W.R. and Dardiri, A.H. (1969). Studies to determine the presence of neutralizing antibody in sera and kidneys from swine recovered from African swine fever. Arch. Ges. Virusforsch. 27: 44-54.
- DeBoer, C.J., Pan, I.C. and Hess, W.R. (1972). Immunology of African swine fever. J. Am. Vet. Med. Assoc. 160(4): 528-532.
- DeKock, G., Robbinson, W.M. and Keppel, J.J.G. (1940). Swine fever in South Africa. Onderstepoort J. Vet. Sci. Animal Ind. 14: 31-93.
- Del Val, M., Carrascosa, J.L. and Viñuela, E. (1986). Glycosilated components of African swine fever virus particles. Virology 152: 39-49.
- Desnoyers, M.M., Haines, D.M. and Searcy, G.P. (1990). Immunohistochemical detection of intermediate filaments in formalin fixed normal and neoplastic canine tissues. Can. J. Vet. Res. 54: 360-365.
- DeTray, D.E. (1957). Persistence of viremia and immunity in African swine fever. Am. J. Vet. Res. 18: 811-816.
- DeTray, D.E. (1961). The incidence of African swine fever in warthogs in Kenya: A preliminary report. J. Am. Vet. Med. Assoc. 138: 78-90.
- DeTray, D.E. (1963). African swine fever. Adv. Vet. Sci. 8: 299-333.
- Diebold, J. (1986). Le système des phagocytes mononuclées. Morphologie et fonctions des principales cellules le constituant. Ann. Pathol. 6(1): 3-12.
- Ditzel, H., Erb, K., Borup-Chistensen, P., Nielsen, B. and Jensenius, J.C. (1991). Evaluation of procedures for the fixation and processing of human tissue for immunohistochemical analysis of human monoclonal antibodies. Hum. Antibod. Hybridomas 2: 135-141.
- Dixon, L. (1988). Molecular cloning and restriction enzyme mapping of an African swine fever virus isolate from Malawi. J. Gen. Virol. 69: 1683-1694.
- Doyle, T.M. (1961). African Pig Disease. Brit. Vet. J. CXVII, 6: 117-229.
- Ducatelle, R. y Hoorens, J. (1986). Cambios ultraestructurales de los eritrocitos en ganglios linfáticos de cerdos con infección natural de Peste Porcina Africana. Med. Vet. 3(7): 7-8.
- Edwards, J.F. and Dodds, W.J. (1985a). Platelet and fibrinogen kinetics in healthy and African swine fever-affected swine: (75-Se) Selenomethionine labeling study. Am. J. Vet. Res. 46(1): 181-184.
- Edwards, J.F., Dodds, W.J. and Slauson, D.O. (1984). Coagulation changes in African swine fever virus infection. Am. J. Vet. Res. 45(11): 2414-2420.
- Edwards, J.F., Dodds, J.W. and Slauson, D.O. (1985b). Megakaryocytic infection and thrombocytopenia in African swine fever. Vet. Pathol. 22: 171-176.
- Edwards, J.F., Dodds, J. and Slauson, D.O. (1985c). Mechanism of thrombocytopenia in African swine fever virus. Am.

- J. Vet. Res. 46(10): 2058-2063.
- Ekue, N.F., Wilkinson, P.J. and Wardley, R.C. (1989). Infection of Pigs with the Cameroon Isolate (Cam/82) of African swine fever virus. J. Comp. Path. 100: 145-154.
- Endris, R.G., Haslett, T.M., Geering, G., Hess, W.R. and Monahan, M.J. (1987). A hemolymph test for the detection of African swine fever virus in *Ornithodoros coriaceus* (Acari: Argasidae). J. Med. Entomol. 24(2): 192-197.
- Endris, R.G., Haslett, T.M. and Hess, W.R. (1992). African swine fever virus infection in the soft tick, *Ornithodoros (Alectorobius) puertoricensis* (Acari: Argasidae). J. Med. Entomol. 29(6): 990-994.
- Enjuanes, L., Carrascosa, A.L., Moreno, M.A. and Viñuela, E. (1976a). Titration of African swine fever (ASF) virus. J. Gen. Virol. 32: 471-477.
- Enjuanes, L., Carrascosa, A.L. and Viñuela, E. (1976b). Isolation and properties of the DNA of African Swine fever virus. J. Gen. Virol. 32: 479-492.
- Enjuanes, L., Cubero, I. and Viñuela, E. (1977). Sensitivity of macrophages from different species to African Swine Fever (ASF) Virus. J. Gen. Virol. 34: 455-463.
- Escribano, J.M., Alcaraz, C., Ruiz Gonzalvo, F. and Pasamontes, B. (1987a). ASFV induced proteins on the plasma membranes of infected cells. African swine fever and pig Immunology. Salamanca, Noviembre, 1987.
- Escribano, J.M. and Tabarés, E. (1987b). Proteins specified by African swine fever virus. V. Identification of immediate early, early and late proteins. Arch. Virol. 92: 221-232.
- Esparza, I., González, J.C. and Viñuela, E. (1988). Effect of Interferon-alfa, Interferon-gamma and Tumour Necrosis Factor on African swine fever virus replication in porcine monocytes and macrophages. J. Gen. Virol. 69: 2973-2980.
- Esteves, A., Marques, M.I. and Costa, J.V. (1986). Two-Dimensional analysis of African swine fever virus proteins induced in infected cells. Virology 152: 192-206.
- Falcón, C. y Núñez, J. (1960). Peste Porcina Africana. Noticias Neosan Diciembre. 104: 487-509.
- Federspiel, G., McCullough, K. and Kihm, U. (1991). Production of monoclonal antibodies specific for African swine fever virus in vitro primary immunization of mouse splenocytes in the presence of stimulated T lymphocyte supernatants. J. Immun. Meth. 145: 71-81.
- Fenner, F. (1976). The classification of nomenclature of viruses. Summary of results of meetings of the international committee on taxonomy of viruses in Madrid, September 1975. Intervirology 6(1): 1-12.
- Fernández, A., Hewicker, M., Trautwein, G., Pohlenz, J. and Liess, B. (1989). Viral antigen distribution in the central nervous system of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. Vet. Pathol. 26: 26-32.
- Fernández, A., Pérez, J., Carrasco, L., Bautista, M.J., Sánchez-Vizcaíno, J.M. and Sierra, M.A. (1992a). Distribution of ASFV antigens in pig tissues experimentally infected with two different Spanish virus isolates. J. Vet. Med. B. 39: 393-402.
- Fernández, A., Pérez, J., Carrasco, L., Gómez-Villamandos, J.C., Sierra, M.A., Sánchez-Vizcaíno, J.M. and Jover, A. (1991a). ASF virus antigen in experimentally infected tissues as demonstrated by immunoperoxidase method. Second Congress of the European Society for Veterinary Virology. Uppsala. Septiembre.
- Fernández, A., Pérez, J., Carrasco, L., Sierra, M.A. and Jover, A. (1991b). Intracytoplasmic immunocomplexes in experimental African swine fever. European Soc. Vet. Pathol. 40th meeting, Friedrichshafen. May.
- Fernández, A., Pérez, J., Carrasco, L., Sierra, M.A., Sánchez-Vizcaíno, J.M. and Jover, A. (1992b). Detection of African swine fever viral antigens in paraffin-embedded tissues by use of immunohistologic methods and polyclonal antibodies. Am. J. Vet. Res. 53(8): 1462-1467.



- Fernández, A., Pérez, J., Martín de las Mulas, J., Carrasco, L., Dominguez, J. and Sierra, M.A. (1992c). Localization of African swine fever viral antigen, swine IgM, IgG and C1q in lung and liver tissues of experimentally infected pigs. J. Comp. Pathol. 107: 81-90.
- Fernández, A., Sierra, M.A., Carrasco, L., Wohlsein, P. and Jover, A. (1990). Immunohistochemischer nachweis von antigen des virus der Afrikanischen schweinepest in macrophagen der lunge und der leber. B.M.T.W. 12(103): 429.
- Firinu, A. and Scarano, C. (1988). African swine fever and classical swine fever (hog cholera) among wild boar in Sardinia. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 7(4): 909-915.
- Forman, A.J., Wardley, R.C. and Norley, S.G. (1983). Interactions of porcine alveolar macrophages and bone marrow cells with African swine fever virus and virus-infected cells. Vet. Microbiol. 8: 163-177.
- Forman, A.J., Wardley, R.C. and Wilkinson, P.J. (1982). The immunological response of pigs and guinea pigs to antigens of African swine fever virus. Arch. Virol. 74: 91-100.
- Galo A. and Nunes Petisca, J.L. (1990). Cellular localization of African swine fever virus (ASFV) nucleic acid, using the in situ hibridization in paraffin embedded tissue sections. Rev. Portug. Ciênc. Vet. 85: 493-494.
- Gans, H. and Lowman, J.T. (1978). The uptake of fibrin and fibrin-degradation products by the isolated perfused rat liver. Blood 45: 256-263.
- García e Costa, F. e Alves de Matos, A.P. (1980). Alterações ultrastruturais do rim em suínos infectados experimentalmente com o vírus da Peste suína africana aguda. Rep. Trab. I.N.V. XII: 33-38.
- García-Barreno, B., Sanz, A., Nogal, M.L., Viñuela, E. and Enjuanes, L. (1986). Monoclonal antibodies of African Swine Fever virus: Antigenic differences among field virus isolates and viruses passaged in cell culture. J. Virol. 58(2): 385-392.
- García-Gancedo, A., Ronda-Lafín, E. y Rubio-Huertos, M. (1974a). Ultraestructura de bazo e hígado de cerdo infectado con Peste porcina africana. Microbiol. Españ. 27: 177-189.
- García-Gancedo, A., Rubio-Huertos, M. y Ronda-Lafín, E. (1974b). Morfogénesis del virus de la Peste Porcina Africana en animales infectados. III reunión nacional de centros de investigación ganadera del CSIC Córdoba. Octubre.
- Gayot, G., Carnero, R., Costes, M.C., Plateau, F., Delclos, G. et Cazaubon, P. (1974). Peste porcine africaine. Isolement et identification en France métropolitaine. Données épidémiologiques, cliniques, anatomopathologiques et de laboratoire. Bull. Acad. Vét. XLNII: 91-97.
- Geering, G., Endris, R.G., Haslett, T.M., Doroski, P.L. and Hess, W.R. (1986). Identification of African swine fever viral antigens in the hemolymph of soft ticks (Argasidae: Ornithodoros) by the immunodot blot test. Am. J. Trop. Med. Hyg. 35(5): 1027-1034.
- Genovesi, E.V., Knudsen, R.C., Whyard, T.C. and Mebus, C.A. (1988). Moderately virulent African swine fever virus infection: blood cell changes and infective virus distribution among blood components. Am. J. Vet. Res. 49(3): 338-344.
- Gentry, P.A. (1992). The mammalian blood platelet: its role in haemostasis, inflammation and tissue repair. J. Comp. Pathol. 107: 243-270.
- Geraldes, A. (1987). Early phases of infection by ASF virus. African swine fever and pig Immunology. Salamanca, Noviembre.
- Giorno, R. (1984). A comparison of two immunoperoxidase staining methods based on the avidin-biotin interaction. Diag. Immunol. 2: 161-166.
- Gómez-Villamandos, J.C. (1988). Morfopatología del hígado de cerdo en la Peste Porcina Africana experimental.

- Relaciones entre el agente causal y el Sistema Mononuclear Fagocítico. Tesis Doctoral. Fac. Vet. Córdoba. Dpto. Anat. y Anat. Pat. Comp.
- González, M. (1985a). Acción del virus de la peste porcina africana sobre diferentes células del sistema inmune del cerdo. Seminario Hispano-Norteamericano de P.P.A. Madrid, Mayo.
- González, A., Calvo, V., Almazan, F., Almendral, J.M., Ramírez, J.C., De la Vega, I., Blasco, R. and Viñuela, E. (1990). Multigene families in African swine fever virus DNA. Family 360. *J. Virol.* 64: 2073-2081.
- González, M., Mebus C.A. and Lunney, J. (1989). Modulation of SLA expression on swine leukocyte antigen expression during infection with African swine fever virus (ASF). Federation of American Societies for Experimental Biology. 73rd Annual Meeting. New Orleans Louisiana March.
- González, M., Mínguez, I. y Sánchez-Vizcaíno, J.M. (1985b). Acción del virus de la PPA sobre diferentes células del sistema inmune del cerdo. Seminario Hispano- Norteamericano de PPA. Madrid.
- González, A., Talavera, A., Almendral, J.M. and Viñuela, E. (1986). Hairpin loop structure of African swine fever virus DNA. *Nucl. Acid. Res.* 14: 6835-6844.
- González Juarrero, M., Lunney, J.K., Sánchez-Vizcaíno, J.M. and Mebus, C. (1992a). Modulation of splenic macrophages, and swine leukocyte antigen (SLA) and viral antigen expression following African swine fever virus (ASFV) inoculation. *Arch. Virol.* 123(1-2): 145-156.
- González Juarrero, M., Mebus, C.A., Pan, R., Revilla, Y., Alonso, J.M. and Lunney, J.K. (1992b). Swine leukocyte antigen and macrophage marker expression on both African swine fever-virus-infected and non-infected primary porcine macrophage cultures. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 32: 243-259.
- Goorha, R. and Granoff, A. (1979). Icosahedral cytoplasmic deoxyriboses. In: Franckel-Conrat H, Wagner RR (eds) *Comprehensive Virology*, vol 14, Plenum, New York: 347-399.
- Gracia, A.D.E. (1961). Diagnóstico de la Peste porcina africana. *Anales del Colegio Oficial de Veterinarios de Barcelona.* 21: 75-79.
- Greig, A. (1972). Pathogenesis of African swine fever in pigs naturally exposed to the disease. *J. Comp. Pathol.* 82: 73-79.
- Greig, A.S., Boulanger, P. and Bannister, G.L. (1967). African swine fever V. Cultivation of the virus in primary pig kidney cells. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* 31: 24-31.
- Greig, A. and Plowright, W. (1970). The excretion of two virulent strains of African swine fever virus by domestic pigs. *J. Hyg.* 68: 673-682.
- Grocock, C.M. and Hess, W.R. (1980). Experimental transmission of ASFV by *Ornithodoros coriaceus*, an Argasid tick indigenous to the U.S. *Am. J. Vet. Res.* 44: 591-594.
- Haag, J. et Larenaudie, B. (1965). Peste porcine africaine. L'effect cytopathogène du virus en culture leucocytaire. *Bull. Off. Int. Epiz.* 63 bis: 191-198.
- Haag, J., Lucas, A., Larenaudie, B., Ruiz Gonzalvo, F. et Carnero, R. (1966). Peste porcine africaine. Recherches sur la taille et la morphologie du virus. *Rec. Méd. Vét.* CXLII(9): 801-808.
- Haines, D.M. and Chelack, B.J. (1991). Technical considerations for developing enzyme immunohistochemical staining procedures on formalin-fixed paraffin-embedded tissues for diagnostic pathology. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3: 101-112.
- Halstead, S.B., Marchette, N.J. and O'rourke, E. (1978). Immunologically enhanced dengue virus infection of mononuclear phagocytes: a mechanism wich may regulate disease severity. *Asian J. Infec. Dis.* 2: 85-93.
- Hamdy, F.M., Colgrove, G.S., De Rodriguez, E.M., Snyder, M.L. and Stewart, W.C. (1981). Field evaluation of

- enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibody to African swine fever virus. Am. J. Vet. Res. 42: 1441-1443.
- Hamdy, F.M. and Dardiri, A. (1980). Detection of antibody to African swine fever virus by enzyme-linked immunosorbent assay. Proc. 2nd Int. Symp. Vet. Lab. Diagnostic., Lucerne, Switzerland, June 1980, pp. 240-243.
- Hamdy, F.M. and Dardiri, A. (1984). Clinical and immunologic responses of pigs to African swine fever virus isolated from the Western Hemisphere. Am. J. Vet. Res. 45: 711-714.
- Haresnape, J.M., Lungu, A.M. and Mamu, F.D. (1987). An updated survey of African swine fever in Malawi. Epidem. Inf. 99: 723-732.
- Haresnape, J.M., Wilkinson, P.J. and Mellor, P.S. (1988). Isolation of African swine fever virus from ticks of the *Ornithodoros moubata* complex (Ixodoidea: Argasidae) collected within the African swine fever enzootic area of Malawi. Epidem. Inf. 101: 173-185.
- Hervás, J., Gómez-Villamandos, J.C., Méndez, A., Carrasco, L., Fernández, A. and Sierra, M.A. (1993). Replicación del VPPA en la nefrona de cerdos inoculados con la cepa Malawi '83. V Reunión de la Sociedad Española de Anatomía Patológica Veterinaria. Barcelona. Junio.
- Hess, W.R. (1971). African swine fever virus. Virol. Monogr. 9: 1-27.
- Hess, W.R. (1981). African Swine Fever: A reassessment. Adv. Vet. Sci. Comp. Med. 25: 39-69.
- Hess, W.R. (1983). La Peste Suina Africana: Un riesame. Rassegna Sci. Vet. 1: 46-70.
- Hess, W.R. (1987a). African swine fever in nature. African Swine Fever Ed. Yechiel Becker. Boston. Chapter 2. pp. 5-9.
- Hess, W.R. (1987b). African swine fever. Introduction. African swine fever Ed. Yechiel Becker. Boston. Chapter 1. pp. 1-4.
- Hess, W.R., Cox, B.F., Heuschele W.P. and Stone, S.S. (1965). Propagation and modification of African swine fever virus in cell cultures. Am J. Vet. Res. 26(110): 141-146.
- Hess, W.R. and DeTray, D.E. (1960). The use of leukocyte cultures for diagnosing of African swine fever (ASF). Bull. Epiz. Dis. Afr. 8: 317-320.
- Heuschele, W.P. (1967). Studies on the pathogenesis of African Swine Fever. I Quantitative studies on the sequential development of virus in pig tissues. Arch. Ges. Virusforsch. 21: 349-355.
- Heuschele, W.P. and Coggins, L. (1965). Isolation of African swine fever virus from a giant forest hog. Bull. Epiz. Dis. Afr. 13: 255-256.
- Heuschele, W.P., Coggins, L. and Stone, S.S. (1966). Fluorescent antibody studies on African swine fever virus. Am. J. Vet. Res. 27(117): 477-484.
- Hingamp, P.M., Arnold, J.E., Mayer, R.J and Dixon, L. (1992). A ubiquitin conjugating enzyme encoded by African swine fever virus. The EMBO Journal 11: 361-366.
- Hogan, D.L. and Smith, G.H. (1982). Unconventional application of standard light and electron immunocytochemical analysis to aldehyde-fixed araldite embedded tissues. J. Histochem. Cytochem. 30: 1301-1306.
- Honor, D.J. (1991). The role of platelets in inflammation and body defense. Continuing Education 13(7): 1129-1137.
- Hsu, S.M., Raine, L. and Fanger, H. (1981). Use of Avidin-Biotin Peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. J. Histochem. Cytochem. 29: 577-580.
- Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C. and Palmer, N. (1993). African swine fever. Pathology of domestic animals Academic

Press: Tome III. Chapter 1. pp. 87-89.

- Kelly, DC. and Robertson, JS. (1973). Icosahedral Cytoplasmic Deoxyrinoviruses. J. Gen. Virol. 20: 17-41.
- Kim, Y.B. (1987). Cytokines and macrophage function. African swine fever and pig Immunology. Salamanca, Noviembre.
- Knudsen, R.C. and Genovesi, E.V. (1987a). In vivo and in vitro effects of moderately virulent African swine fever virus on mitogenesis of pig lymphocytes. Vet. Immunol. Immunopathol. 15: 323-336.
- Knudsen, R.C., Genovesi, E.V., Whyard T.C., and Wool, S.H. (1987b). Cytopathogenic effect of African swine fever virus for pig monocytes: Characterization and use in microassay. Vet. Microb. 14: 15-24.
- Köhler, G. and Milstein, C. (1979). Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of predefined specificity. Nature. 256: 495-497.
- Konno, S., Taylor, W.D. and Dardiri, A.H. (1971a). Acute African swine fever. Proliferative phase in lymphoreticular tissue and the reticuloendothelial system. Cornell Vet. LXI(1): 71-84.
- Konno, S., Taylor, W.D., Hess, W.R. and Heuschele, W. P. (1971b). Liver pathology in African swine fever. Cornell Vet. LXI(1): 125-150.
- Konno, S., Taylor, W.D., Hess, W.R. and Heuschele, W.P. (1972). Spleen pathology in African swine fever. Cornell Vet. 3: 71-84.
- Kooistra, L., Splitter, G.A. and Albrecht, R.M. (1985). Identification of feline monocytes and neutrophils as effector cells in antibody-dependent cellular cytotoxicity: Sequential analysis, using light microscopy, histochemistry, and scanning electron microscopy. Am. J. Vet. Res. 46(12): 2626-2633.
- Kovalenko, J.R. (1965). Methods for infecting pigs with African swine fever virus. Tr. Usesoiuznogo Inst. Eksp. Vet. 31: 336-341.
- Kovalenko, J.R., Sidorov, M.A. y Burba, L.G. (1967). Las manifestaciones clínicas en los cerdos infectados experimentalmente con el virus de la PPA. Arch. Vet. Práct. 1: 40.
- Kuznar, J., Salas, M.L. and Viñuela, E. (1980). DNA-dependent RNA-polymerase in African swine fever virus. Virology 101: 169-175.
- Kuznar, J., Salas, M.L. and Viñuela, E. (1981). Nucleoside triphosphate phosphohydrolase activities in African swine fever virus. Arch. Virol. 96: 307-320.
- Larenaudie, B., Toulhier, M.C., Sangucci, J. et Carnero, R. (1967). Etude en microscopie électronique de l'hémadsorption provoquée par le virus de la peste porcine africaine. Rec. Med. Vét. CXLIII: 925-935.
- Lasser, A. (1982). The mononuclear system. Prog. Pathol. 108-124.
- Lawman, M.J.P., Martins, C.V., Mebus, C.A. and Luney, J. (1987). Modulation of porcine peripheral blood-derived macrophage function by in vitro infection with African swine fever virus (ASFV) isolates of different virulence. African swine fever and pig Immunology. Salamanca. Noviembre.
- Letchworth, G.J. and Whyard, T.C. (1984). Characterization of African swine fever virus antigenic proteins by immunoprecipitation. Arch. Virol. 80: 265-274.
- Ley, V., Almendral, J.M., Carbonero, P., Beloso, A., Viñuela E. and Talavera, A. (1984). Molecular cloning of African swine fever virus DNA. Virology 133: 271-275.
- López-Otín, C., Freije, J.M., Parra, F., Méndez, E. and Viñuela, E. (1990). Mapping and sequence of the gene coding for protein p72, the major capsid protein of African swine fever virus. Virology 175: 477-484.
- López-Otín, C., Simón-Mateo, C., Martínez, L. and Viñuela, E. (1989). Gly-Gly-X, a novel consensus sequence for the

- proteolytic processing of viral and cellular proteins. J. Biol. Chem. 264(16): 9107-9110.
- López-Otín, C., Simón-Mateo, C., Méndez, E. and Viñuela, E. (1988). Mapping and sequence of the gene encoding protein p37, a major structural protein of African swine fever virus. Virus Genes 1: 291-303.
- Lucas, A., Haag, J. y Larenaudie, B. (1970). Peste porcina africana. L'Expansion Scientifique Française Paris.
- Lunney, J.K. (1987). Introduction to cellular immunology. African swine fever and pig Immunology. Salamanca, Noviembre.
- Malmquist, W.A. (1962). Propagation, modification, and hemadsorption of African swine fever virus in cell cultures. Am. J. Vet. Res. March: 241-247.
- Malmquist, W.A. (1963). Serologic and immunologic studies with African swine fever virus. Am. J. Vet. Res. 24(100): 450-459.
- Malmquist, W.A. and Hay, D. (1960). Hemadsorption and cytopathic effect produced by African swine fever virus in swine bone marrow and buffy coat cultures. Am. J. Vet. Res. 21(80): 104-108.
- Manso Ribeiro, J. et Rosa Azevedo, J.A. (1961). Réapparición de la Peste Porcine Africaine (PPA) au Portugal. Bull. Off. Int. Epiz. 55: 88-106.
- Manso Ribeiro, J., Rosa Azevedo, J.A., Texeira, M.J.O., Braço Forte, M.C., Rodrigues Ribeiro, A.M., Oliveira, F., Grave Pereira, C. et Dias Vigario, J. (1958). Peste porcine provoquée par une souche différente (souche L) de la souche classique. Bull. Off. Int. Epiz. 50: 516- 534.
- Martín de las Mulas, J., Fernández, A., Sierra, M.A., Poveda, J.B. and Carranza, J. (1990). Immunohistochemical demonstration of *Micoplasma gallinarum* and *Mycoplasma gallinaceum* in naturally infected hen oviducts. Res. Vet. Sci. 49: 339-345.
- Martín-Fernández, J., Igual, A., Rueda, A., Sánchez-Vizcaíno, J.M. and Alonso-Martí, C. (1991). Glomerular pathology in surviving pigs experimentally infected with African swine fever virus. Histol. Histopathol. 6: 115-121.
- Martins, C. (1987). T cell responses to ASFV infection. African swine fever and pig Immunology. Salamanca, Noviembre.
- Martins, C., Mebus, C.A., Scholl, T., Lawman, M. and Lunney, J. (1988). Virus-Specific CTL in SLA-Inbred swine recovered from experimental African swine fever virus (ASFV) infection. Annals N.Y. Acad. of Sci. 532: 462-464.
- Mateo, A., Arias, M.L. y Sánchez-Vizcaíno, J.M. (1985). Anticuerpos monoclonales: I. Producción y caracterización. Med. Vet. 2(5-6): 261-279.
- Maurer, F., Grisemer, R. and Jones, T.C. (1958). The pathology of African swine fever. A comparison with hog cholera. Am. J. Vet. Res. 19: 517-539.
- Maurer, F., Grisemer, R. and Jones, T.C. (1964). Fiebre porcina africana. En: Enfermedades del cerdo. Dunne. Ed. UTHEA. Mex.: 199-215.
- Mattews, R.E.F. (1982). Classification and nomenclature of viruses. Ed. Krager, Basel.
- Mecomb, R.D., Jones, T.R., Pizzo, S.V. and Bigner, D.D. (1982). Specificity and sensitivity of immunohistochemical detection of Factor VIII/ von Willebrand factor antigen in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. J. Histochem. Cytochem. 4: 371-377.
- McCullough, K.C. and Spier, R.E. (1990). Monoclonal antibodies in Biotechnology- Theoretical and practical aspects (Cambridge studies in Biotechnology, vol. 8). Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- McDaniel, H.A. (1986). African Swine Fever. In: Diseases of swine. Viral Diseases. Iowa State Univ. Press 6th. Ed.

Section 3, Chapter 18. pp. 300-309.

- McVicar, J.W. (1984). Quantitative aspects of the transmission of African swine fever. Am. J. Vet. Res. 45(8): 1535-1541.
- McVicar, J.W., Mebus, C.A., Becker, H.N., Belden, A.C. and Gibbs, E.P.J. (1981). Induced African swine fever in feral pigs. J. Am. Vet. Med. Assoc. 179(9): 441-447.
- Mebus, C.A. (1987). Pathobiology and pathogenesis. African swine fever. Ed. Y. Becker.: Boston-. Chapter 4. pp. 20-29.
- Mebus, C.A. (1988). African swine fever. Adv. Virus Res. 35: 251-269.
- Mebus, C.A. and Dardiri, A.H. (1979). Additional characteristics of disease caused by the African swine fever viruses isolated from Brazil and the Dominican Republic. Proc. Annu. Meet. US. Anim. Health Assoc. 83: 227-239.
- Mebus, C.A. and Dardiri, A.H. (1980). Western hemisphere isolates of African swine fever virus: Asymptomatic carriers and resistance to challenge inoculation. Am J. Vet. Res. 41(11): 1867-1869.
- Mebus, C.A. y Gregg, D.A. (1985). Evaluación de la función in vivo del macrófago en la Peste porcina africana. Seminario Hispano-Norteamericano sobre Peste Porcina Africana. Madrid. Mayo.
- Mebus, C.A., McVicar, J.W. and Dardiri, A.H. (1983). Comparison of the pathology of high and low virulence African swine fever virus infections. Commission of the European Communities EUR 8466 EN: 183-185.
- Meehan, J.T., Cutlip, R.C. and Lelinkuhl, H.D. (1989). Evaluation of ethylenediaminetetraacetic acid, tetrasodium salt dihydrate (EDTA)-Tween 20. Treatment versus protease digestion of formalin-fixed tissue sections for detection of bovine respiratory syncytial virus antigen in infected ovine lung. Vet. Pathol. 26: 322-325.
- Mellor, P.S. and Wilkinson, P.J. (1985). Experimental transmission of African swine fever virus by *Ornithodoros savignyi* (Audouin). Res. Vet. Sci. 39: 353-356.
- Mendoza, C., González, S. Martín, J., Arias, M., Domínguez, J., Alonso, F. and Sánchez-Vizcaíno, J.M. (1987). Mechanisms of cytotoxicity in African swine fever. African swine fever and pig immunology. Salamanca, Noviembre.
- Mendoza, C., Videgain, S.P. and Alonso, F. (1991). Inhibition of natural killer activity in porcine mononuclear cells by African swine fever virus. Res. Vet. Sci. 51: 317-321.
- Mercadé, J. (1961). Cuadro y diagnóstico clínico de la Peste Porcina Africana. Anales del Colegio Oficial de Veterinarios de Barcelona 21: 67-73.
- Miller, J.M. and Van Der Maaten, M.J. (1989). Demonstration of infectious bovine rhinotracheitis virus antigen in paraffin sections. J. Vet. Diag. Invest. 1: 105-109.
- Mims, C.A. (1987). Pathogenesis of viral disease. Ed. Acad. Press. New York.
- Mínguez, I., Rueda, A., Domínguez, J. and Sánchez-Vizcaíno, J.M. (1988). Double labeling immunohistological study of ASFV infected spleen and lymph nodes. Vet. Pathol. 25(3): 193-198.
- Montgomery, R.E. (1921). On a form of swine fever occurring in British East Africa (Kenya Colony). J. Comp. Pathol. 34: 159-191, 243-262.
- Morgensen, S.C. (1979). Role of macrophage in natural resistance to virus infections. Microb. Rev. 43: 1-26.
- Moulton, J. and Coggins, L. (1968). Comparison of lesions in acute and chronic African swine fever. Cornell Vet. 58: 364-387.
- Moulton, J.E., Pan, I.C., Hess, W.R., DeBoer, C.J. and Tessler, J. (1975). Pathologic features of chronic pneumonia in pigs with experimentally induced African swine fever. Am. J. Vet. Res. 36: 27-31.

- Moura Nunes, J.F., Alves de Matos, A.P., Vigarío, J.D., Castro Portugal, F.L. e Ferreira, C.A. (1980). Estrutura do vírus da Peste suína africana (PSA). Rep. Trab. I.N.V. XII: 65-70.
- Moura Nunes, J.F. and Nunes-Petisca, J.L. (1983). Replication of African swine fever virus in lymph nodes of experimentally infected Swine. Commission of the European Communities EUR 8466 EN: 132-142.
- Moura Nunes, J.F., Vigarío, J.D. and Terrinha, A.M. (1975). Ultrastructural study of African swine fever virus replication in cultures of swine bone marrow cells. Arch. Virol. 49: 59-66.
- Nagle, R.B. (1983). Immunohistochemical demonstration of keratins in human ovarian neoplasms. A comparison of methods. J. Histochem. Cytochem. 31: 1010-1016.
- Narita, M., Kawamura, H., Haritani, M. and Kobayashi, M. (1989a). Demonstration of viral antigen and immunoglobulin (IgG and IgM) in brain tissue of pigs experimentally infected with haemagglutinating encephalomyelitis virus. J. Comp. Pathol. 100: 119-128.
- Narita, M., Kawamura, H., Tsuboi, T., Haritani, M. and Kobayashi, M. (1989b). Immunopathological and ultrastructural studies on the Tonsil of Gnotobiotic pigs infected with strain 67N of Haemagglutinating Encephalomyelitis virus. J. Comp. Pathol. 100: 305-312.
- Nesser, J.A. and Kotzé, C. (1987). African swine fever. II. Functional disturbances of thrombocytes in pigs infected with virulent haemadsorbing and non-haemadsorbing virus isolates. Onderstepoort J. Vet. Res. 54: 147-155.
- Nesser, J.A., Phillips, T., Thomson, G.R., Gainaru, M.D. and Coetzee, T. (1986). African swine fever. I. Morphological changes and virus replication in blood platelets of pigs infected with virulent haemadsorbing and non-haemadsorbing isolates. Onderstepoort J. Vet. Res. 53: 133-141.
- Norley, S.G. and Wardley, R.C. (1982). Complement-mediated lysis of african swine fever virus-infected cells. Immunology 46: 75-82.
- Norley, S.G. and Wardley, R.C. (1983a). Investigation of porcine natural-killer cells activity with reference to African swine fever virus infection. Immunology 49: 593-597.
- Norley, S.G. and Wardley, R.C. (1983b). Effector mechanisms in the pig. Antibody-dependent cellular cytolysis of African swine fever virus infected cells. Res. Vet. Sci. 35: 75-79.
- Norley, S.G. and Wardley, R.C. (1984). Cytotoxic lymphocytes induced by African swine fever infection. Res. Vet. Sci. 37: 255-257.
- Nunes Petisca, J.L. (1965a). Etudes anatomo-pathologiques et histopathologiques sur la Peste porcine africaine (Virose L) au Portugal. Bull. Off. Int. Epiz. 63: 103-142.
- Nunes Petisca, J.L. (1965b). Quelques aspects morphologiques des suites de la vaccination contre la Peste Porcine Africaine (Virose L) au Portugal. Bull. Off. Int. Epiz. 63bis: 199-237.
- Nunes Petisca, J.L. and Martins Gonçalves, J.M. (1976). The evolution of the histopathological picture on pigs experimentally infected with acute African swine Fever virus (lymph nodes, spleen, thymus and bone-marrow). Commission of the European Communities. EUR 5904 EN: 612-627.
- Nunes Petisca, J.L. e Martins Gonçalves, J.M. (1978). Evolução do quadro histopatológico em suínos infectados experimentalmente com o vírus da Peste suína africana aguda. Rep. Trab. L.N.I.V. X: 17-22.
- Oldstone, M.B.A., Sinha, Y.N., Bolunt, P., Tishon, A., Rodríguez, M., Webel, R. and Lampert, P.W. (1982). Virus-induced alterations in homeostasis: alterations in differentiated functions of infected cells in vivo. Science 218: 770-774.
- Ordás, A. (1983a). Problemas actuales de la Peste Porcina Africana. Noticias Neosán 213: 89-93

- Ordás, A. and Marcotegui, M.A. (1985). African swine fever, clinical aspects. In: African Swine Fever Ed. Yechiel Becker. Boston. Chapter 3. pp. 11-20.
- Ordás, A., Sánchez-Botija, C., Bruyel, V. and Olias, J. (1983b). African swine fever, the current situation in Spain. Commission of the European Communities. EUR 8466 EN: 7-11.
- Ortín, J., Enjuanes, L. and Viñuela, E. (1979). Cross-links in African swine fever virus DNA. J. Virol. 31: 579-583.
- Ortín, J. and Viñuela, E. (1977). Requirement of cell nucleus for African swine fever virus replication in vero cells. J. Virol. 21(3): 902-905
- Osborn, M. and Weber, K. (1983). Biology of disease. Tumor diagnosis by intermediate filament typing: A novel tool for surgical pathology. Lab. Invest. 48: 372-394.
- Osterud, B., Lindahl, U. and Seljelid, R. (1980). Macrophage produce blood coagulation factors. FEBS. Lett. 120: 41-43.
- Palacín, A. (1984). Técnicas inmunohistoquímicas. Aspectos teórico-prácticos. Ed. ATOM S.A. Barcelona.
- Pan, I.C. (1987). Spontaneously susceptible cells and cell culture methodologies for ASFV. In: African swine fever. Ed. Yechiel Becker. Boston. Chapter 9. pp. 81-126.
- Pan, I.C., DeBoer, C.J. and Heuschele, W.P. (1970). Hypergammaglobulinemia in swine infected with African swine fever virus (34794). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 134: 367-371.
- Pan, I.C. and Hess, W.R. (1984). Virulence in African swine fever: Its measurement and implications. Am. J. Vet. Res. 45(2): 361-366
- Pan, I.C. and Hess, W.R. (1985). Diversity of African swine fever virus. Am. J. Vet. Res. 46(2): 314-320
- Pan, I.C., Moulton, J.E. and Hess, W.R. (1975). Immunofluorescent studies on chronic pneumonia in swine with experimentally induced African swine fever. Am. J. Vet. Res. 36: 379-386
- Pan, I.C., Shimizu, M. and Hess, W.R. (1980). Replication of African swine fever virus in cells cultures. Am. J. Vet. Res. 46: 314-320.
- Pan, I.C., Whyard, T.C., Hess, W.R., Yuasa, N. and Shimizu, M. (1988). Epitopic diversity of African swine fever virus. Virus Res. 9: 93-106.
- Passalacqua, M., Ribeiro, A.S., Vilanova, M., Porto, M.T., Santarem, M.G. and Lima, M. (1988). Correlation between B-cell mitogenicity and immunosuppressor effects of a protein released by porcine monocytes infected with African swine fever virus. Am. J. Vet. Res. 49(11): 1955-1961.
- Pastor, M.J., Arias, M. and Escribano, J.M. (1990). Comparison of two antigens for use in an enzyme-linked immunosorbent assay to detect African swine fever antibody. Am. J. Vet. Res. 51(19): 1540-1543.
- Pastor, M.J., Laviada, M.D., Sánchez-Vizcaíno, J.M. and Escribano, J.M. (1989). Detection of African swine fever virus antibodies by immunoblotting assay. Can. J. Vet. Res. 53: 105-107.
- Peiris, J.S.M., Gordon, S., Unkless, J.C. and Porterfield, J.S. (1981). Monoclonal anti-Fc receptor IgG blocks antibody enhancement of viral replication in macrophages. Nature 289: 189-191
- Pérez, J. (1989). Morfopatología de Ganglios Linfáticos en Peste Porcina Africana Experimental: (Aislado E-70). Tesina de Licenciatura. Fac. Vet. Córdoba. Dpto. Anat. y Anat. Pat. Comp.
- Pérez, J. (1992). Peste Porcina Africana Experimental (Aislado E70 y E75): Estudio Inmunohistopatológico del Hígado y Pulmón. Tesis Doctoral. Fac. Vet. Córdoba. Dpto. Anat. y Anat. Pat. Comp.
- Pérez, J., Bautista, M.J., Rodríguez, J., Espinosa, A., Poveda, J. y Fernández A. (1990). Aportación de las técnicas



- inmunohistoquímicas al diagnóstico e investigación en patología veterinaria. I Simposium sobre avances y perspectivas en inmunohistoquímica e histoquímica. Cádiz. Octubre.
- Pesce, A.J. and Dosekun, A.K. (1982). Interrelations between the immune system, complement, coagulation and inflammation. Clin. Physiol. Biochem. 1: 92-116.
- Pierce, C.W. (1980). Macrophages: Modulators of immunity. Am. Assoc. Pathol. 98(1):10-27
- Pini, A. (1976). Isolation and segregation of non-haemadsorbing strains of African swine fever virus. Vet. Rec. 99: 479-480.
- Plowright, W. (1980). African Swine Fever. In: Viral Diseases. Part I. Chapter 14: 178-190.
- Plowright, W., Brown, F. and Parker, J. (1966). Evidence for the type of nucleic acid in ASFV. Arch. Ges. Virusforsch. 19: 289-304.
- Plowright, W. and Parker, J. (1967). The stability of African swine fever virus with particular reference to heat and pH inactivation. Arch. Ges. Virusforsch. 21: 383-402.
- Plowright, W., Parker, J. and Pierce, M.A. (1969a). The epizootiology of African swine fever in Africa. Vet. Rec. 85: 668-674.
- Plowright, W., Parker, J. and Pierce, M.A. (1969b). African swine fever virus in ticks (*Ornithodoros moubata*, Murray) collected from animal burrows in Tanzania. Nature 221: 1071-1073.
- Plowright, W., Parker, J. and Staple, R.F. (1968). The growth of a virulent strain of African swine fever virus in domestic pigs. Hyg. Camb. 66: 117-134
- Plowright, W., Perry, C.T. and Pierce, M.A. (1970a). Transovarial infection with African swine fever virus in the argasid tick, *Ornithodoros moubata porcinus*, Walton. Res. Vet. Sci. 11: 582-584.
- Plowright, W., Perry, C.T., Pierce, M.A. and Parker, J. (1970b). Experimental infection of the argasid tick, *Ornithodoros moubata porcinus* with African swine fever virus. Arch. Ges. Virusforsch. 31: 33-50.
- Polatnick, J. and Hess, W.R. (1972). Increased deoxyribonucleic acid polymerase activity in African swine fever virus infected cells. Arch. Ges. Virusforsch. 38: 383-385.
- Polo Jover, F. and Sánchez-Botija, C. (1961). African swine fever in Spain. Bull. Off. Int. Epiz. 55: 107-147.
- Porter, D.D., Larsen, E.A. and Porter, H.G. (1973). The pathogenesis of Aleutian disease of Mink. III Immunocomplexes arteritis. Am. J. Pathol. 45(2): 331-344.
- Quezada, M. (1988). Morfopatología del riñón de cerdo en la peste porcina africana experimental. Tesis Doctoral. Fac. Vet. Córdoba. Dpto. Anat. y Anat. Pat. Comp.
- Quezada, M., Sierra, M.A., Carrasco, L., Méndez, A. and Blanco, A. (1989). Experimental African swine fever with an attenuated strain of the virus (España 75): evidence of disseminated intravascular coagulation. 73. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie. Koblenz. Mayo.
- Quintero, J.C., Wesley, R.D., Whyard, T.C., Gregg, D. and Mebus, C. A. (1986). In vitro and in vivo association of African swine fever virus with swine erythrocytes. Am. J. Vet. Res. 47(5): 1125-1131
- Ravaioli, L., Palliola, E. and Ioppoto, A. (1967). ASF in wild boars. Note 1. Possibility of experimental infections by inoculation. Vet. Ital. 18: 499-513.
- Revilla, Y., Pena, L. and Viñuela, E. (1988). A protein of molar mass 12 KDa incorporates into the membrane of ASF virus-infected cells. Virus Res. 11: 193-197.
- Revilla, Y., Pena, L. and Viñuela, E. (1992). Interferon-Gamma production by African swine fever virus-specific

- lymphocytes. Scand. J. Immunol. 35: 225-230.
- Rodríguez, O.N. (1972). Alteraciones en el cuadro hematológico durante el curso de la fiebre porcina africana. Rvta. Cub. Cienc. Vet. 3: 19-26.
- Rodríguez, O.N., Fernández, A., Chamizo, E. y Del Pozo, E. (1972). Observaciones clínicas y morfológicas en el brote de fiebre porcina africana en Cuba. Rvta. Cub. Cienc. Vet. 3: 1-18.
- Roitt, I.M., Brostoff, J. y Male, D.K. (1986). *Inmunología*. Ed. Gower Medical Publishing Ltda. Barcelona.
- Ruiz Gonzalvo, F., Caballero, C., Martínez, J. and Carnero, M.E. (1986a). Neutralization of African swine fever virus by sera from African swine fever-resistant pigs. Am. J. Vet. Res. 47(8): 1858-1862.
- Ruiz Gonzalvo, F., Carnero, M.E. and Bruyel, V. (1983). Immunological response of pigs to partially attenuated African swine fever virus and their resistance to virulent homologous and heterologous viruses. In: P.J. Wilkinson. Ed. African Swine Fever, Proc. EUR 8466 EN, CEC/FAO Research Seminar, Sardinia, September 1981, pp. 206-216.
- Ruiz Gonzalvo, F., Carnero, M.E., Caballero, C. and Martínez, J. (1986b). Inhibition of African swine fever infection in the presence of immune sera in vivo and in vitro. Am. J. Vet. Res. 47(6): 1249-1252.
- Ruiz Gonzalvo, F., Fernández, M., Domínguez, J. and Alonso, F. (1987). New approaches to African swine fever virus neutralization. Personal Communication.
- Ruiz Gonzalvo, F., Haag, J., Carnero, R. and Larenaudie, B. (1966). Peste porcine africaine. Adaptation d'une souche de virus aux cultures de rein de porc. Rec. Méd. Vét. CXLII(12): 1237-1249.
- Ruiz Martínez, C. (1978). La Peste porcina africana a través de la Oficina Internacional de Epizootias. Ed. Sucre. Parte I. pp. 15-46.
- Sabatini, D.D., Bensch, K. and Barnett, R.J. (1963). Cytochemistry and electron microscopy: The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. J. Cell. Biol. 17: 19-58.
- Sainte-Marie, G. (1962). A paraffin embedding technique for studies employing immunofluorescence. J. Histochem. Cytochem. 10: 250-256.
- Salas, M.L., Kuznar, J. and Viñuela, E. (1981). Polyadenylation, methylation and mapping of the RNA synthesized in vitro by African swine fever virus. Virology 113: 484-491.
- Salas, M.L., Kuznar, J. and Viñuela, E. (1983). Effect of rifamycin derivatives and coumermycin A1 on in vitro RNA synthesis by African swine fever virus. Arch. Virol. 77: 77-80.
- Salas, M.L., Salas, J. and Viñuela, E. (1988). Phosphorilations of African swine fever virus proteins in vitro and in vivo. Biochem. 70: 627-635.
- Saliki, J., Thiry, E. et Pastoret, P.P. (1985). La peste porcine africaine. Ann. Méd. Vét. 129: 59-69
- Sánchez Botija, C. (1963a). Modificación del virus de la Peste Porcina Africana en cultivos celulares. Bull. Off. Int. Epiz. 60: 901-919.
- Sánchez Botija, C. (1963b). Reservorios del virus de la peste porcina africana. Investigación del virus de la PPA en los artrópodos mediante la prueba de la hemoadsorción. Bull. Off. Int. Epiz. 60: 895-899.
- Sánchez Botija, C. (1967). Modificaciones morfológicas que experimentan los leucocitos de la sangre circulante del cerdo en los cultivos y origen celular de los macrófagos. Rev. Patronato Biol. Animal 11(2): 5-17.
- Sánchez Botija, C. (1982). Peste porcina africana. Nuevos desarrollos. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 1(4): 991-1029.
- Sánchez Botija, C. y Ordás, A. (1980). Peste porcina africana. Noticias Neosán Número especial: Patología y clínica del ganado porcino: 118-154.

- Sánchez Botija, C., Ordás, A., Gonzalvo, F.R. and Solana, A. (1977). Procedures in use for diagnosis of African swine fever. Agricultural research seminar on classical swine fever and African swine fever. CEE. EUR/ 5.904.
- Sánchez-Vizcaíno, J.M. (1986a). Peste porcina africana. Publi. Ministerios Afric. Pesca y Alim. INIA. Madrid.
- Sánchez-Vizcaíno, J.M. (1992). African Swine Fever. In: Diseases of Swine. Viral Diseases. Iowa State Univ. Press. 7th. Ed. Secc. 2, Chapter 12, pp 228-236.
- Sánchez-Vizcaíno, J.M., Mebus, C.A., McVicar, J.W. and Valero, F. (1983a). Studies on humoral and cell mediated immunity in pigs and piglets infected with different field isolates of African swine fever virus. Commission of the European Communities. EUR 8466 EN: 195-205.
- Sánchez-Vizcaíno, J.M. y Ordás, A. (1985). Peste porcina africana. Hojas divulgativas del Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación N 18/85HD.
- Sánchez-Vizcaíno, J.M. y Ordás, A. (1986b). La Peste porcina africana. Nuestra Cabaña Agosto. 33-37.
- Sánchez-Vizcaíno, J.M., Slauson, D.O., Ruiz-Gonzalvo, F. and Valero, F. (1981). Lymphocyte function and cell-mediated immunity in pigs with experimentally induced African swine fever. Am. J. Vet. Res. 42(8): 1335-1341.
- Sánchez-Vizcaíno, J.M., Tabarés, E., Salvador, E. and Ordás, A. (1983b). Comparative study of two antigens for use in the indirect ELISA test for the detection of African swine fever antibodies. In: P.J. Wilkinson (Ed.), African Swine Fever EUR 8466 EN, Proc. CEC/FAO Research Seminar, Sardinia, September 1981, pp. 101-106.
- Sánchez-Vizcaíno, J.M., Tabarés, E., Salvador, E. and Sánchez-Botija, A. (1982). Semipurified structural viral protein for the detection of African swine fever antibodies by the indirect ELISA technique. Curr. Top. Vet. Med. An. Sci. 22: 214-222.
- Santarén, J.F. and Viñuela, E. (1986). African swine fever virus-induced polypeptides in Vero cells. Virus Res. 5: 391-405.
- Sanz, A., García-Barreno, B., Nogal, M.L., Viñuela, E. and Enjuanes, L. (1985). Monoclonal antibodies specific for African swine fever virus proteins. J. Virol. 34: 199-206.
- Schlafer, D.H. and Mebus, C.A. (1984a). Abortion in sows experimentally infected with African swine fever virus: Clinical features. Am. J. Vet. Res. 45(7): 1353-1360.
- Schlafer, D.H., Mebus, C.A. and McVicar, J.W. (1984b). African swine fever in neonatal pigs: Passively acquired protection from colostrum or serum of recovered pigs. Am. J. Vet. Res. 45(7): 1367-1372.
- Scholl, T., Lunney, J.K., Mebus, C.A., Duffy, A. and Martins, C.L.V. (1989). Virus-specific cellular blastogenesis and interleukin-2 production in swine after recovery from African swine fever. Am. J. Vet. Res. 50(10): 1781-1786.
- Schreier, M.H. (1979). In vitro immunization of dissociated murine spleen cells. In: Immunological Methods. Academic Press, N.Y. Chapter 24 pp. 327-334.
- Schultz, R.D., Yang, W.C. and Kostenbader, J.J. (1987). Cytotoxic effector mechanisms. African swine fever and pig Immunology. Salamanca, Noviembre.
- Scott, G.R. (1965). The virus of African swine fever and its transmission. Bull. Off. Int. Epiz. 63(5-6): 645-677.
- Séculi, J. y Costa, P. (1961). Peste Porcina Africana. Presentación en España y evolución en la provincia de Barcelona. Noticias Neosán: 8-71.
- Shimizu, M., Pan, I.C. and Hess, W.R. (1977). Cellular immunity demonstrated in pigs infected with African swine fever virus. Am. J. Vet. Res. 38(1): 27-31.
- Sierra, M.A., Bernabé, A., Mozos, E., Méndez, A. and Jover, A. (1987). Ultrastructure of the liver in pigs with

- experimental African Swine Fever. Vet. Pathol. 24: 460-462.
- Sierra, M.A., Carrasco, L., Gómez-Villamandos, J.C., Martín de las Mulas, J., Méndez, A. and Jover, A. (1990a). Pulmonary intravascular macrophages in pigs inoculated with African swine fever virus of differing virulence. J. Comp. Pathol. 102: 323-334.
- Sierra, M.A., Fernández, A., Martín de las Mulas, J., Pérez, J. and Jover, A. (1990b). Immunohistopathological and ultrastructural studies of the liver of pigs experimentally infected with A.S.F. virus (Strains E70 and E75). 10th Autumn Meeting of the ESVP. Zürich. Septiembre.
- Sierra, M.A., Gómez-Villamandos, J.C., Carrasco, L., Fernández, A. and Mozos, E. (1991). In vivo study of the haemadsorption reaction in African swine fever virus infected cells. Vet. Pathol. 28: 178-181.
- Sierra, M.A., Jover, A., Gómez, M.A., Navarro, J.A. and Bernabé, A. (1986). Anatomía patológica de la Peste porcina africana: Introducción. Cuadro lesional. Órganos linforreticulares. Nuestra Cabaña 168: 54-59.
- Sierra, M.A., Martín de las Mulas, J. and Jover, A. (1993). La Peste Porcina Africana: características clínicas y anatomopatológicas. Tratado del Ganado Porcino. Porci (17): 47-58.
- Sierra, M.A., Quezada, M., Fernández, A., Carrasco, L., Gómez-Villamandos, J.C. Martín de las Mulas, J. and Sánchez-Vizcaíno, J.M. (1989). Experimental African swine fever: Evidence of the virus in interstitial tissues of the kidney. Vet. Pathol. 26(2): 173-176.
- Sissons, J.G.P. and Borysiewicz, L.K. (1985). Viral immunopathology. Brit. Med. Bull. 41(1): 34-40.
- Slauson, D.O. and Sánchez-Vizcaíno, J.M. (1981). Leukocyte- Dependent platelet vasoactive amine release and immune complex deposition in African swine fever. Vet. Pathol. 18: 813-826
- Smith, J.W., Jachimowicz, J.R. and Bingham, E.L. (1986). Binding and internalization of Herpes simplex virus-antibody complexes by polymorphonuclear leukocytes. J. Med. Virol. 20: 151-163.
- Sogo, J.M., Almendral, J.M., Talavera, A. and Viñuela, E. (1984). Terminal and internal inverted repetitions in African swine fever virus DNA. Virology 133: 271-275.
- Steyn, D.G.(1928). Preliminary report on South African virus disease amongst pigs. 13th-14th. Rep. Dir. Vet. Ser. S. Afr. 415.
- Steyn, D.G. (1932). East african disease in pigs. Rep. Vet. Res. Union S. Afr. 18: 99-109.
- Stone, S.S. and Hess, W.R. (1967). Antibody response to inactivated preparations of African swine fever virus in pigs. Am. J. Vet. Res. 28(123): 475-481.
- Stone, S.S. and Hess, W.R. (1973). Effects of some disinfectants on African swine fever virus. Appl. Microb. 25: 115-122.
- Tabarés, E. (1987a). Characterization of ASFV proteins. In: African swine fever. Ed. Yechiel Becker. Boston. Chapter 6. pp. 51-61.
- Tabarés, E., Fernández, M., Salvador, E., Carnero, M.E. and Sánchez Botija, C. (1981). A reliable enzyme linked immunosorbent assay for African swine fever using the major structural protein and antigenic reagent. Arch. Virol. 70: 297-300.
- Tabarés, E., Marcotegui, M.A., Fernández, M. and Sánchez Botija, C. (1980). Proteins specified by African swine fever virus: I. Analysis of viral structural proteins and antigenic properties. Arch. Virol. 66: 107-117.
- Tabarés, E., Martínez, J., Martín, E. and Escribano, J.M. (1983). Proteins specified by African swine fever virus. IV Glycoproteins and phosphoproteins. Arch. Virol. 77: 167-180.
- Tabarés, E., Olivares, I., Santurde, G., García, M.J., Martín, E. and Carnero, M.E. (1987b). African swine fever

- virus DNA: deletions and additions during adaptation to growth in monkey kidney cells. Arch. Virol. 97: 333-346.
- Tabarés, E. and Sánchez Botija, C. (1979). Synthesis of DNA in cells infected with African swine fever virus. Arch. Virol. 61: 49-59.
- Takamatsu, H., Hutchings, G., McLeod, A., Anderson, E. and Wilkinson, P.J. (1987). Are porcine lymphocytes susceptible to ASF virus infection. African swine fever and pig Immunology. Salamanca. Noviembre.
- Taylor, C.R. (1985). Monoclonal antibodies and "routine" paraffin sections. Arch. Pathol. Lab. Med. 109: 115-116.
- Terpstra, C. (1987). Differential diagnosis between African swine fever and hog cholera. In: African Swine Fever Ed. Yechiel Becker. Boston. Chapter 8. pp. 73-80.
- Thomson, G.R., Gainaru, M.D. and Van Dellen, A.F. (1979). African swine fever: Pathogenicity and immunogenicity of two non-haemadsorbing viruses. Onderstepoort J. Vet. Res. 46: 149-154.
- Topley, W.W.V. (1990). African swine fever: Clinical and pathological aspects. In: Yopley and Wilson's. Principles of Bacteriology, Virology and Immunity. Ed. Edward Arnold. London. Vol. 4 pp. 624-629.
- Tubiash, H.J. (1963). Quantity production of leucocyte cultures for use in haemadsorption test with African swine fever. Am. J. Vet. Res. 24: 381-384.
- Unanue, E.R. (1976). Secretory function of Mononuclear Phagocytes. Am. J. Pathol. 83(2): 396-411.
- Urzainqui, A., Tabarés, E. and Carrasco, L., (1987). Proteins synthesized in African swine fever virus-infected cells analyzed by two-dimensional gel electrophoresis. Virology 160: 286-291.
- Valdeira, M.L. and Geraldés, A. (1985). Morphological study on the entry of African swine fever virus into cells. Biol. Cell. 55: 35-40.
- Vigario, J.D., Castro Portugal, F.L., Ferreira, C.A. and Fiestas, M.B. (1977). Purification and studies of the structural polypeptides of African swine fever virus. CEC/FAO expert consultation on Hog cholera/classical swine fever and African swine fever research. Commission of European Communities EUR/5.904 EN: 469-482.
- Vigario, J.D., Relvas, M.E., Ferraz, F.P., Ribeiro, J.M. and Pereira, G.C. (1976). Identification and localization of genetic material of African swine fever virus by autoradiography. Virology 33: 173-175.
- Vigario, J.D., Terrinha, A.M., Bastos, A.L., Moura-Nunes, J.F., Marques, D. and Silva, J.F. (1970). Serological behaviour of isolated African Swine fever virus. Arch. Ges. Virusforsch. 31: 387-389.
- Vigario, J.D., Vasco, S.G., Castro Portugal, F.L. and Festas, M.B. (1983). Experimental studies with African swine fever virus carriers. In: P.J. Wilkinson (ed.). African Swine Fever EUR 8466 EN, Proc. CEC/FAO Research Seminar, Sardinia, September, 1981. pp. 63-66.
- Villeda, C.J., Williams, S.M., Wilkinson, P.J. and Viñuela, E. (1993). Haemostatic abnormalities in African swine fever. A comparison of two virus strains of different virulence (Dominican Republic '78 and Malta '78). Arch. Virol. 130: 71-83.
- Viñuela, E. (1985). African swine fever virus. Curr. Top. Microb. Immunol. 116: 151-170.
- Wardley, R.C. (1982). Effect of African swine fever on lymphocyte mitogenesis. Immunology 46: 215-220.
- Wardley, R.C., Andrade, C.M., Black, D.N., Castro, F.L., Enjuanes, L., Hess, W.R., Mebus, C., Ordás, A., Rutili, D., Sánchez-Vizcaíno, J.M., Vigario, J.D., Wilkinson, P.J., Moura Nunes, J.F. and Thomson, G. (1983). African swine fever virus. Arch. Virol. 76: 73-90.
- Wardley, R.C., Hamilton, F. and Wilkinson, P.J. (1979). The replication of virulent and attenuated strains of African swine fever virus in porcine macrophages. Arch. Virol. 61: 217-225.

- Wardley, R.C., Norley, S.G., Wilkinson, P.J. and Williams, S.M. (1985). The role of antibody in protection against African swine fever virus. Vet. Immunol. Immunopathol. 9: 201-212.
- Wardley, R.C. and Wilkinson P.J. (1977a). The association of African swine fever virus with blood components of infected pigs. Arch. Virol. 55: 327-334.
- Wardley, R.C. and Wilkinson, P.J. (1977b). The growth of virulent African swine fever virus in pig monocytes and macrophages. J. Gen. Virol. 38: 183-186.
- Wardley, R.C. and Wilkinson, P.J. (1980a). Lymphocyte responses to African swine fever virus infection. Res. Vet. Sci. 28: 185-189.
- Wardley, R.C. and Wilkinson, P.J. (1980b). Detection of African swine fever antigen and antibody by radioimmunoassay. Vet. Microb. 5: 169-176.
- Wardley, R.C., Wilkinson, P.J. and Hamilton, F. (1977c). African swine fever virus replication in porcine lymphocytes. J. Gen. Virol. 37: 425-427.
- Warner, A.E. and Brain, J.D. (1986). Intravascular pulmonary macrophages: a novel cell removes particles from blood. Am. Physiol. Soc. 728-732.
- Warner, A.E., DeCamp, M.M., Molina, R.M. and Brain, J.D. (1988). Pulmonary removal of circulating endotoxin results in acute lung injury in sheep. Lab. Invest. 59: 219-230.
- Wensvoort, G., Terpstra, C. and Bloemraad, M. (1988). Detection of antibodies against African swine fever virus using infected monolayers and monoclonal antibodies. Vet. Rec. 122: 536-539.
- Wensvoort, G., Terpstra, C., Boonstra, J., Bloemraad, M. and Van Zaane, D. (1986). Production of monoclonal antibodies against swine fever virus and their use in laboratory diagnosis. Vet. Microb. 12: 101-108.
- Wesley, R.D. and Pan, I.C. (1982). African swine fever virus DNA: restriction endonuclease cleavage patterns of wild-type Vero cell-adapted and plaque-purified virus. J. Gen. Virol. 63: 383-391.
- Wesley, R.D. and Tuthill, A.E. (1984). Genome relatedness among African swine fever virus field isolates by restriction endonuclease analysis. Prev. Vet. Med. 2: 53-62.
- Whyard, T.C., Wool, S.H. and Letchworth, G.J. (1985). Monoclonal antibodies against African swine fever viral antigens. Virology 142: 416-420.
- Wildy, P. (1971). Classification and nomenclature of viruses. Monogr. Virol. 5: 1-81.
- Wilkinson, P.J. (1989). African Swine Fever. In: *Virus Infections of Vertebrates*. Vol. 2: *Virus Infections of Porcines*. M.B. Pensaert. Ed. Elsevier Science Publishers. Chapter 2. pp. 17-35.
- Wilkinson, P.J. and Donaldson, A.I. (1977a). Transmission studies with African swine fever virus. The early distribution of virus in pigs infected by airborne virus. J. Comp. Pathol. 87: 497-501.
- Wilkinson, P.J., Donaldson, A.I., Greig, A. and Bruce, W. (1977b). Transmission studies with ASFV. Infection of pigs by airborne virus. J. Comp. Pathol. 87: 487-495.
- Wilkinson, P.J. and Lawman, W.J.P. (1980). African swine fever in Malta, 1978. Vet. Rec. 106(5): 94-97.
- Wilkinson, P.J. and Wardley, R.C. (1978). The replication of African swine fever virus in pig endothelial cells. Br. Vet. J. 134: 280-282.
- Wilkinson, P.J., Wardley, R.C. and Williams, S.M. (1981). African swine fever virus (Malta/78) in pigs. J. Comp. Pathol. 91: 277-284.
- Wilkinson, P.J., Wardley, R.C. and Williams, S.M. (1983). Studies in pigs infected with African swine fever virus

- (Malta/78). In: P.J. Wilkinson (Ed.). African Swine Fever, EUR 8466 EN, Proc. CEC/FAO Research. Seminar. Sardinia, September pp:74-84.
- William, R., Hess, W.R., Pan, I.C.** (1976). The immune response in African swine fever. Commission of the European Communities EUR 5904 EN: 602-611.
- Williams, D.M. and Rowland, A.C.** (1972). The palatine tonsils of the pig -an afferent route to the lymphoid tissue. J. Anat. 113: 131-137.
- Winkler, G.C.** (1989). Developmental biology in pigs. In: The pulmonary intravascular macrophage. Norman C. Staub. Ed. Futura Publishing Company. New York. pp. 1-22.
- Wesley, R.D., Quintero, J.C. and Mebus, C.A.** (1984). Extration of viral DNA from erythrocytes of swine with acute African swine fever. Am. J. Vet. Res. 45: 1127-1131.
- Wohlsein, P., trautwein, G., Stolze, B., Haas, L. and Kaaden, O.R.** (1990). Antigen distribution in organs of Mink with Aleutian disease parvovirus infection. J. Vet. Med. B. 37: 651-659.