

DETECCIÓN DE PROTEÍNAS DE FASE AGUDA EN CERDOS AFECTADOS CLÍNICAMENTE POR EL SÍNDROME DE ADELGAZAMIENTO MULTISISTÉMICO POST-DESTETE

Acute phase proteins detection in pigs affected clinically by postweaning multisystemic wasting syndrome

Pallarés, F.J.^{1*}; Gómez, S.¹; Cerón, J.J.²; Seva, J.¹; Ramis, G.³; Martínez-Subiela, S.²; Parra, M.D.²; Tecles, F.²; Martínez, J.S.³; Gómez, M.A.¹; Bernabé, A.¹; Muñoz, A.³

¹Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas. ²Departamento de Medicina y Cirugía Animal. ³Departamento de Producción Animal. Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia. 30071, Murcia. España.

* Autor de referencia: pallares@um.es

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue comparar los niveles en suero de tres proteínas de fase aguda (PFAs): haptoglobina (HP), proteína C reactiva (CRP) y amiloide A sérica (SAA) en cerdos afectados clínicamente por el síndrome de adelgazamiento multisistémico post-destete (PMWS) y cerdos sanos libres de patógenos específicos (SPF), así como determinar la posible relación entre la gravedad de las lesiones de los cerdos afectados por PMWS y las concentraciones de esas PFAs. Los niveles de las tres PFAs estudiadas presentaron un aumento estadísticamente significativo comparado con los de los cerdos SPF tomados como control. Se encontró una correlación con tendencia a la significancia estadística ($p=0,072$) entre los niveles de SAA y las lesiones pulmonares microscópicas.

Palabras clave: cerdo, PMWS, PCV2, lesiones, proteínas de fase aguda.

ABSTRACT

The objective of this study was to compare the serum levels of three acute phase proteins (APPs): haptoglobin (HP), C reactive protein (CRP) and serum amyloid A (SAA) in pigs clinically affected by PMWS and healthy specific pathogen free (SPF) pigs and to determine the possible relationship between the severity of lesions in PMWS affected pigs and the concentrations of these APPs. The levels of all three APPs studied were statistically significant higher in PMWS affected pigs than in SPF control pigs. A correlation with trend to statistical significance ($p=0,072$) between the score of microscopic lung lesions and SAA levels was found.

Keywords: pig, PMWS, PCV2, lesions, acute phase proteins.

INTRODUCCIÓN

El síndrome de adelgazamiento multisistémico post-destete (PMWS) asociado con el circovirus porcino tipo 2 (PCV2) fue descrito por primera vez en Canadá en 1991 (Clark 1997; Harding 1997). El primer caso en España se diagnosticó en 1997 (Segalés et al. 1997). Actualmente, este síndrome se encuentra ampliamente distribuido en todos los países productores de porcino (Segalés et al. 1997; Kennedy et al. 1998; Choi et al. 2000; Madec et al., 2000; Pallarés et al. 2002). Se trata de un proceso que afecta a cerdos entre las semanas 5 y 18 de edad y se caracteriza clínicamente por una pérdida progresiva de peso, disnea, anemia e ictericia (Harding y Clark 1997; Sorden 2000; Harding 2004). Las lesiones microscópicas más características son la aparición de depleción linfoide y una infiltración de macrófagos y células gigantes multinucleadas en los órganos linfoides. Otras lesiones descritas en el síndrome son la aparición de neumonía intersticial, hepatitis y nefritis (Rosell et al. 1999).

La respuesta de fase aguda es una reacción compleja no específica del organismo que ocurre rápidamente tras cualquier daño tisular. El origen de la respuesta puede atribuirse a múltiples causas de muy distinta naturaleza como infecciosas, inmunológicas, neoplásicas o traumáticas; y su principal misión es restaurar la homeostasia y hacer desaparecer la causa de la alteración (Whicher y Westacott 1992; Ebersole y Capella 2000). Se considera como una parte del sistema defensivo innato del hospedador, que es el responsable de la defensa de éste durante los primeros momentos del ataque por cualquier agente (Eckersall 2000). Una de las principales características de esta respuesta de fase aguda, además de cursar con fiebre, leucocitosis y otras alteraciones metabólicas, es la aparición de cambios en la concentración de proteínas plasmáticas llamadas proteínas de fase aguda (PFAs) (Eckersall 1995). Se denominan PFAs negativas a aquellas que descien-

den en su concentración, como la albúmina o la transferrina, y PFAs positivas a aquellas que aumentan en su concentración, como la proteína C-reactiva (CRP), amiloide A sérica (SAA), haptoglobina (HP), alfa-1 glicoproteína ácida, pig-major acute phase protein (pig-MAP), ceruloplasmina o fibrinógeno. Las PFAs positivas son principalmente glicoproteínas sintetizadas sobre todo por los hepatocitos tras la estimulación mediante citoquinas pro-inflamatorias y liberadas a la circulación sanguínea.

El objetivo de este trabajo fue comparar los niveles de tres PFAs en cerdos afectados clínicamente por el PMWS y cerdos sanos libres de patógenos específicos (SPF) de la misma edad y determinar la posible relación entre la gravedad de las lesiones de los cerdos afectados por PMWS y las concentraciones de esas PFAs.

MATERIAL Y MÉTODOS

En este experimento se ha utilizado un total de 7 cerdos cruce Landrace x Large White x Duroc afectados clínicamente por PMWS procedentes de explotaciones porcinas situadas en la Región de Murcia (España). El criterio para determinar el diagnóstico de PMWS fue el propuesto por Sorden (2000): presencia de signos clínicos, presencia de lesiones histológicas características y la demostración de la presencia del virus asociado a las lesiones.

Se realizaron las necropsias regladas de todos los animales. Para el estudio histopatológico se tomaron muestras de pulmón, nódulos linfáticos, tonsilas, bazo, corazón, hígado, riñón, encéfalo e intestino que se fijaron en formol al 10%. A las lesiones microscópicas estudiadas se les asignó una puntuación (Cuadro 1) con el fin de obtener valores numéricos para establecer posibles relaciones estadísticas con los niveles de PFAs.

Para determinar la presencia de PCV2 se realizó una técnica de PCR (Agüero et al. 2000) para la detección de genoma vírico en mues-

Cuadro 1: Criterio de puntuación de las lesiones microscópicas estudiadas

Lesión	Puntuación	Criterio
Neumonía intersticial	0-3	0: ausencia, 1: leve, 2: moderada, 3: grave
Inflamación granulomatosa en órganos linfoides	0-3	0: ausencia, 1: leve, 2: moderada, 3: grave
Bronconeumonía bacteriana	0-1	0: ausencia, 1: presencia
Hepatitis intersticial no purulenta	0-1	0: ausencia, 1: presencia
Nefritis intersticial no purulenta	0-1	0: ausencia, 1: presencia

Cuadro 2: Comparación de las concentraciones de PFAs en cerdos afectados clínicamente por PMWS y animales SPF utilizados como controles y niveles de significancia estadística

Proteína	Grupo	Medias por mínimos cuadrados	Error estándar	Nivel de significancia
Haptoglobina	Afectados	4,259	0,426	P<0,001
	Controles	0,831	0,426	
Proteína C reactiva	Afectados	166,635	24,526	P<0,05
	Controles	31,098	24,526	
Amiloide A sérica	Afectados	86,664	4,772	P<0,001
	Controles	25,789	4,772	

tras de pulmón y tejidos linfoides. Asimismo, se determinó la presencia de genoma de virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS) en pulmón mediante PCR (Donadeu et al. 1999).

La medición de la concentración en suero de las PFAs estudiadas (HP, CRP y SAA) se realizó mediante la técnica de ELISA utilizando kits comerciales (Tridelta Ltd, Irlanda). Para establecer niveles control de PFAs para la comparación con los animales afectados clínicamente por PMWS se recogieron muestras de sangre de 7 cerdos SPF cruce Landrace x Large White de 16 a 18 semanas de edad.

Para los estudios estadísticos se utilizó en programa SYSTAT 5.0TM para Windows (SYSTAT, Inc., Evanston, IL, USA). Para establecer las posibles diferencias entre los niveles de PFAs de los animales afectados por PMWS y

los niveles en animales control SPF se realizaron análisis de varianza. Para establecer las correlaciones entre las puntuaciones de las lesiones y los niveles de PFAs en los animales afectados por PMWS se realizaron análisis de correlación de Pearson.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El diagnóstico de PMWS fue confirmado en los animales estudiados por la presencia de los signos clínicos, las lesiones microscópicas y la detección del genoma de PCV2 en las muestras estudiadas mediante la técnica de PCR. De los 7 animales afectados por PMWS, 4 presentaron neumonía intersticial, con una puntuación media de 1,3. Asimismo, 4 de 7 presentaron bronconeumonía bacteriana. La combinación de lesiones de neumonía intersticial y bronco-

neumonía bacteriana se observó en 2 de los 7 cerdos. La inflamación granulomatosa en órganos linfoides apareció en 3 de 7, con una puntuación media de 0,7. Las lesiones de hepatitis intersticial no purulenta se encontraron en todos los animales y la nefritis intersticial no purulenta en 6 de ellos.

De los 7 animales estudiados, 5 presentaron coinfección con el virus PRRS. De estos 5 animales, 4 presentaron lesiones de neumonía intersticial. La neumonía intersticial es una lesión que ha sido descrita en infecciones tanto por virus PRRS (Halbur et al. 1995) como por PCV2 (Rosell et al. 1999), pero en este caso, excepto en uno de los cerdos, los animales con infección por el virus PRRS son los que presentan neumonía intersticial, por lo que en estos animales la lesión pulmonar podría deberse más a la acción del virus PRRS que a la de PCV2. La coinfección por estos dos virus es frecuente en casos de campo de PMWS (Pallarés et al. 2002), y ha sido utilizada como modelo experimental para la reproducción del síndrome (Allan et al. 2000; Harms et al. 2001; Rovira et al. 2002). Experimentos realizados por Krakowka et al. (2001) indican que la activación del sistema inmune jugaría un papel fundamental en el desarrollo del PMWS. En estos casos, la estimulación del sistema inmune provocada por la infección por el virus PRRS podría ser la que provocara que la infección por PCV2 evolucionase hasta dar lugar al PMWS.

Los niveles de PFAs en los animales afectados por PMWS presentan diferencias estadísticamente significativas con los hallados en cerdos SPF sanos tomados como control (Cuadro 2). Las PFAs analizadas en este estudio se consideran positivas ya que como respuesta se produce un aumento en su concentración. Los niveles de PFAs en los animales con PMWS comparados con los de los animales SPF aumentan 5,1 veces en el caso de la HP, 5,3 veces en la CRP y 3,3 veces en la SAA. El aumento significativo de los niveles de HP en cerdos afectados por PMWS en comparación con

cerdos sanos ha sido descrito previamente por Segalés et al. (2004). En ese estudio, además de aumento de los niveles de HP también se detectó un aumento en los niveles de pig-MAP, tomándose ambos, como indicadores del estado sanitario y de bienestar de granjas afectadas por PMWS. También han sido descritos aumentos de los niveles de CRP en cerdos gnotobióticos infectados experimentalmente por PCV2 y en cerdos convencionales en casos de campo de PMWS (Allan et al. 2003). Asimismo, los niveles de SAA también podrían ser utilizados como indicadores del estado sanitario de las explotaciones porcinas afectadas por PMWS, aunque hasta el momento no existen estudios publicados donde se haya medido esta PFA en esta enfermedad.

En el presente estudio, 5 de los 7 animales afectados por PMWS presentan coinfección con el virus PRRS. Se ha comprobado que tras la infección con este virus también hay un aumento de los niveles de HP (Asai et al. 1999). El valor medio de la concentración de HP de los animales coinfectados fue 4,6 mg/ml mientras que el de los animales infectados solamente con PCV2 fue 3,2 mg/ml, aunque el número de especímenes estudiado no permite establecer diferencias estadísticamente significativas entre ambos subgrupos. En conocimiento de los autores no existen hasta el momento publicaciones referidas al estudio de los niveles de CRP y SAA en cerdos infectados por el virus PRRS. Sería de gran interés estudiar la dinámica de PFAs en animales coinfectados experimentalmente por PCV2 y virus PRRS, una de las asociaciones más frecuentes en las explotaciones porcinas, con el fin de determinar si los animales infectados por los dos virus presentan evolución y valores de estas proteínas diferentes a los infectados solamente por uno de ellos.

No se encontró una correlación estadísticamente significativa entre las puntuaciones de las lesiones microscópicas y los niveles de PFAs, pero en el caso de la SAA existía una correlación con tendencia hacia la significancia estadística

($p=0,072$) entre su concentración y las lesiones pulmonares (neumonía intersticial y bronconeumonía bacteriana), lo que indicaría que cuando estas lesiones aparecen habría un aumento en los niveles de SAA. En cerdos, los niveles de HP y CRP parecen ser los mejores marcadores para la identificación de lesiones inflamatorias (Eckersall et al. 1996), pero en nuestro estudio no existe relación estadísticamente significativa entre estos y las puntuaciones de las lesiones microscópicas, hecho probablemente debido a que el número de animales estudiados es pequeño. Estudios similares con mayor número de animales podrían corroborar estos resultados y determinar si la concentración de SAA podría ser un indicador útil de la presencia de lesiones inflamatorias, al menos a nivel pulmonar, en el cerdo.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha sido financiado gracias a un proyecto de investigación de la Fundación Séneca (AGR/14/02). Los autores quieren agradecer a D. Juan Sánchez y D. Carlos de Jódar su colaboración técnica.

BIBLIOGRAFÍA

- Agüero M., Arias M., Sánchez-Vizcaino J.M. 2000. Development of a novel multiplex PCR for porcine circoviruses detection and preliminary field testing. Proceedings of the 5th International Congress of Veterinary Virology.
- Allan G.M., McNeilly F., Ellis J., Krakowka S., Meehan B., McNair I., Walker I., Kennedy S. 2000. Experimental infection of colostrum deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication. *Arch. Virol.* 145: 2421-2429.
- Allan G.M., McNeilly F., Meehan B.M., Krakowka S., Ellis J.A., Botner A., McCullough K., Charreyre, C. 2003. PCV2/PMWS field studies, experimental infections and immunological parameters. Proceedings of the British Society of Animal Science, 222.
- Asai T.; Mori M.; Okada M.; Uruno K.; Yazawa S.; Shibata I. 1999. Elevated serum haptoglobin in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 70: 143-148.
- Choi C., Chae C., Clark E.G. 2000. Porcine postweaning multisystemic wasting syndrome in Korean pig: detection of porcine circovirus 2 infection by immunohistochemistry and polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12:151-153.
- Clark E.G. 1997. Post-weaning multisystemic wasting syndrome. Proceedings of the American Association of Swine Practitioners 28, 499-501.
- Donadeu M., Arias M., Gomez-Tejedor C., Agüero M., Romero J., Christianson W., Sanchez-Vizcaino J.M. 1999. Using PCR to obtain PRRSV-free piglets from endemically infected herds. *Swine health Prod.* 7: 255-261.
- Ebersole J.L., Cappelli D. 2000. Acute-phase reactants in infections and inflammatory diseases. *Periodontol.* 2000 23: 19-49.
- Eckersall P.D. 1995. Acute phase proteins as markers of inflammatory lesions. *Comp. Haematol. Int.* 5: 93-97.
- Eckersall P.D., Saini P.K., McComb C. 1996. The acute phase response of acid soluble glycoprotein, alpha (1)-acid glycoprotein, ceruloplasmin, haptoglobin and C-reactive protein, in the pig. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 51: 377-385.
- Eckersall P.D. 2000. Acute phase proteins as markers of infection and inflammation: monitoring animal health, animal welfare and food safety. *Irish Vet. J.* 53: 307-311.
- Halbur P.G., Paul P.S., Frey M.L., Landgraf J., Eernisse K., Meng X-J., Lum M.A., Andrews J.J., Rathje J.A. 1995. Comparison of the pathogenicity of two U.S. porcine re-

- productive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. *Vet. Pathol.* 32: 648-660.
- Harding J.C.S. 1997. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS): preliminary epidemiology and clinical presentation. *Proceedings of the American Association of Swine Practitioners* 28, 503.
- Harding J.C.S., Clark E.G. 1997. Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Swine Health Prod.* 5: 201-203.
- Harding J.C.S. 2004. The clinical expression and emergence of porcine circovirus. *Vet. Microbiol.* 98: 131-135.
- Harms P.A., Sorden S.D., Halbur P.G., Bolin S.R., Lager K.M., Morozov I., Paul P.S. 2001. Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Pathol.* 38: 528-539.
- Kennedy S., Allan G., McNeilly F., Adair B.M., Hughes A., Spillane P. 1998. Porcine circovirus infection in Northern Ireland. *Vet. Rec.* 142: 495-496.
- Krakowa S., Ellis J.A., McNeilly F., Ringler S., Rings D.M., Allan G. 2001. Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV-2). *Vet. Pathol.* 38: 31-42.
- Madec F., Eveno E., Morvan P., Hamon L., Blanchard P., Cariolet R., Amena N., Morvan H., Truong C., Mahé C., Albina E., Jestin A. 2000. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in France: clinical observations from follow-up studies on affected farms. *Livest. Prod. Sci.* 63: 223-233.
- Pallarés F.J., Halbur P.G., Opriessnig T., Sorden S.D., Villar D., Janke B.H., Yaeger M.J., Larson D.J., Schwartz K.J., Yoon K.J., Hoffman L.J. 2002. Porcine circovirus type 2 (PCV-2) coinfections in US field cases of post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *J. Vet. Diagn. Invest.* 14: 515-519.
- Rosell C., Segalés J., Plana-Durán J., Balasch M., Rodríguez-Arrijoja G., Kennedy S., Allan G., McNeilly F., Latimer K., Domingo M. 1999. Pathological, immunohistochemical and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *J. Comp. Pathol.* 120: 59-78.
- Rovira A., Balasch M., Segalés J., García L., Plana-Durán J., Rosell C., Ellerbrok H., Mankertz A., Domingo M. 2002. Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2. *J. Virol.* 76: 3232-3239.
- Segalés J., Sitjar M., Domingo M., Dee S., Del Pozo M., Noval R., Sacristán C., De las Heras A., Ferro A., Latimer K.S. 1997. First report of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Spain. *Vet. Rec.* 141: 600-601.
- Segalés J., Piñeiro C.; Lampreave F.; Nofrarías M.; Mateu E.; Casamiglia M.; Andrés M.; Morales J.; Piñeiro M.; Domingo M. 2004. Haptoglobin and pig-major acute protein are increased in pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet. Res.* 35: 275-282.
- Sorden S.D. 2000. Update on porcine circovirus and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Swine Health Prod.* 8: 133-136.
- Whicher J.T., Westacott C.I. 1992. The acute phase response. In: Whicher JT, Evans SW, eds. *Biochemistry of inflammation*. 1st ed. London: Kluwer Academic, 243