



## PB-MED01-02. Estudio de la patogenia del virus de la enfermedad hemorrágica del conejo

### Investigador responsable

Dr. José Migueel Prieto Martín

### Organismo

SERIDA

### Equipo investigador

Dr. Alberto Espí Felgueroso  
Dr. Francisco Parra Fernández

SERIDA  
Univ. Oviedo

de inespecificidad al tratarse de suero y tejidos de la misma especie. Nuestro equipo ha sido el primero en usar un antisuero producido en cobaya frente a la proteína viral VP60, lo que nos permite una mejor interpretación de la técnica inmunohistoquímica (Prieto et al. 2000).

### Objetivos

- Ampliar el conocimiento sobre el mecanismo de infección del virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV)
- Estudiar la posible apoptosis en los linfocitos y macrófagos del hígado y bazo.

En el presente proyecto hemos realizado la conjugación con oro coloidal (5 nm) del antisuero de cobaya anti-VP60 y lo hemos aplicado para llevar a cabo observaciones de inmunomicroscopía electrónica de transmisión. Los tejidos procesados han sido los procedentes de una infección experimental con el RHDV. Dos animales de cada vez fueron sacrificados, mediante inyección intraperitoneal de pentotal sódico, a las 12, 24 y 36 hpi. El hígado y bazo fueron procesados paralelamente para la realización de las técnicas histológicas, inmunohistoquímicas e inmuno-electrohistoquímicas.

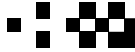
### Resultados

#### Mecanismo de infección del RHDV

La RHD es una enfermedad que afecta tanto a los conejos domésticos como a los silvestres, produciendo la muerte en el 90% de los animales entre las 48-72 horas después de la infección (hpi). El hallazgo patológico más importante es una severa hepatitis necrótica y coagulación intravascular diseminada (Marcato et al. 1991). El agente causal de la RHD es un virus miembro de la familia Caliciviridae (Parra y Prieto 1990; Ohlinger et al. 1990). Los antígenos virales se pueden detectar mediante técnicas inmunohistoquímicas, encontrando el virus en los hepatocitos, macrófagos y monocitos circulantes (Park et al. 1992). Todos los antisueros utilizados hasta la fecha, han sido los procedentes de animales supervivientes a la infección, lo que puede dar lugar a problemas

Como resultados preliminares podemos señalar que el virus se replica abundantemente en los hepatocitos, siendo detectado a las 12, 18 y 36 hpi en el 0,03%, 3% y 25% de los hepatocitos respectivamente; la VP60 fue identificada a partir de las 36 hpi en los macrófagos y linfocitos de la pulpa roja y áreas perifoliculares del bazo. Mediante las técnicas inmuno-electrohistoquímicas, hemos observado que incluso a las 12 hpi existen alteraciones importantes en los hepatocitos, como picnosis y cariorrexis, siendo bastante generalizadas cuando han transcurrido 36 hpi; además, en este caso, se han podido observar fragmentos de membranas citoplasmáticas, numerosos lisosomas, grandes gotas de lípidos y redondeamiento de las mitocondrias. En algunas áreas pueden observarse partículas de un diámetro de unos 30-40 nm, que por su forma y tamaño podrían tratarse del RHDV. Sin embargo, las partículas de oro coloidal sólo las hemos observado en





escaso número y sin estar asociadas a ninguna estructura determinada, apareciendo con una media de unas dos partículas por campo a 20.000 aumentos, lo que nos hace pensar que la técnica empleada (inclusión con resina epoxi) ha enmascarado los antígenos diana.

### Apoptosis en la RHD

La apoptosis es una muerte celular programada, que está caracterizada por una serie de cambios morfológicos: condensación de la cromatina, vesiculización flácida del plasma de la membrana, fragmentación del ADN y picnosis. La apoptosis es un mecanismo genético y molecular de muerte celular, que se produce en una gran variedad de enfermedades en el hombre y los animales: cáncer, desórdenes inmunológicos y neurológicos, enfermedades cardiovasculares e infecciosas y como conse-

cuencia del consumo de determinadas drogas anticáncer (Mirlos *et al.* 1996). En la RHD la infección induce la muerte celular en los hepatocitos mediante el fenómeno de la apoptosis (Alonso *et al.* 1998; Jung *et al.* 2000). La técnica utilizada para detectar la apoptosis ha sido la detección del enzima terminal transferasa deoxynucleotidil (TUNEL). Pero, a pesar de ser la técnica histoquímica más utilizada, presenta problemas para diferenciar células necróticas de las muertas por apoptosis (Dong *et al.* 1997). En nuestro caso, hemos utilizado el monoclonal anti-ssDNA F7-26, que reconoce una simple cadena de ADN terminal como marcador de apoptosis (Frankfurt *et al.* 1997). Como resultados preliminares hemos podido confirmar que la apoptosis fue detectada en los hepatocitos a las 29 hpi, existiendo células muy positivas en el 10 % de los hepatocitos. Como novedad podemos señalar que hemos detectado apoptosis en algunos macrófagos del bazo.

## RTA02-048. Paratuberculosis bovina en Asturias. prevalencia y evaluación de la interferencia con la prueba de la tuberculina

### Investigador responsable

Dr. José Miguel Prieto Martín

### Organismo

SERIDA

de saneamiento de la tuberculosis bovina en Asturias.

### Equipo investigador

Dr. Alberto Espí Felgueroso  
Isabel Márquez Llano-Ponte  
Ana Balseiro Morales  
Dr. Francisco García Marín  
Dra. Ana Mateos García

SERIDA  
SERIDA  
SERIDA  
Univ. León  
UCM Madrid

■ Estudio de la prevalencia e incidencia anual de la paratuberculosis bovina en Asturias.

### Objetivos

■ Establecer y valorar las reacciones cruzadas de los animales infectados con *M. avium paratuberculosis* con la prueba de la intradermorreacción que se emplea en la campaña

### Resultados

#### Reacciones cruzadas de los animales infectados con *M. Avium paratuberculosis* con la prueba de la intradermorreacción

Durante este primer año de trabajo se han desarrollado las siguientes tareas: