

**DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE PARTÍCULAS VIRALES DE VIRUS
PARAINFLUENZA TIPO 3 EN PULMONES NEUMÓNICOS OVINOS
Y CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA DE LAS LESIONES ASOCIADAS**

**IMMUNOHISTOCHEMICAL DETECTION OF PARAINFLUENZA TYPE 3 VIRUS
PARTICLES IN OVINE LUNGS AND HISTOLOGICAL CHARACTERISATION
OF PNEUMONIC LESIONS**

CARLOS M. GONZÁLEZ (MV, MPhil, PhD); RAQUEL CEPEDA (TM); JULIO CANTILLANO (MV);
MARICRUZ SANTIBÁÑEZ (TP) Y PATRICIO BERRÍOS (MV, MSc, PhD)*

SUMMARY

The pulmonary pathology of parainfluenza type 3 (PIV-3) infection in sheep was investigated firstly by detecting in situ virus particles in cases of sheep pneumonia, negative to bacteriological isolation but positive to isolation of parainfluenza type 3 virus (PIV-3); secondly by characterizing the associated lesions by gross pathology and histopathology. PIV-3 particles were detected by indirect immunalkaline-phosphatase staining with monoclonal antibodies and rabbit polyclonal.

The main gross lesion consisted in areas of consolidation which showed a reddish brown color and contained small gray foci on their cut surface. These areas were confined only to the anterior lobes of the lungs. These consolidated areas, on cross section of the lung, were found to be distributed extensively throughout affected lobes and appeared to follow the smaller bronchi and bronchioles. The mediastinal and bronchial lymph nodes were hyperemic and slightly enlarged. Histopathological findings were interstitial pneumonia with hyperplasia of bronchiolar associated lymphoid tissue (BALT), degenerative bronchiolar epithelium with lymphocyte infiltration, areas of atelectasis and increased alveolar septa thickness due to proliferation of type II pneumocytes, lymphocytes, macrophages and to fibrosis. Virus particles, were observed more frequently in bronchiolar epithelial cells than in alveolar septal cells and occasionally in alveolar macrophages. The large number of lymphocytes, combined with the minimal to moderate cytolysis of viral antigen bearing cells suggests that PIV-3-induced pulmonary lesions have an immunopathological component.

KEY WORDS: Parainfluenza type 3 virus, sheep pneumonia, immunohistochemistry.

PALABRAS CLAVES: Virus parainfluenza tipo 3, neumonía ovina, inmunohistoquímica.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones virales que afectan al aparato respiratorio representan la mayor causa de morbilidad en diferentes grupos etarios. La mortalidad puede ser alta cuando afectan a animales de edades extremas provocando importantes pérdidas económicas (Yates, 1988).

Los paramyxovirus infectan una gran variedad de mamíferos y aves, pero estos virus son especies específicas. Estas infecciones pueden provocar desde un cuadro asintomático hasta causar cerca del 100% de mortalidad (Vainionpää y col., 1989). Entre ellos, el virus parainfluenza tipo 3 (VPI-3), un virus ARN (Dimock y Collins, 1993), es una de las causas más difundidas de neumonía intersticial y ha sido aislado en diferentes países, incluyendo Chile (Berríos y col., 1990; Berríos y col., 1991). El virus, por sí solo, generalmente produce cuadros respiratorios benignos, sin embargo, predispone a cuadros clínicos severos producidos por bacterias

* Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. Casilla 2 Correo 15 La Granja. Santiago, Chile. Trabajo financiado por Proyecto DTI 3516, Universidad de Chile.

tales como *Pasteurella haemolytica*, *Corynebacterium sp.* o *Rickettsias* (Yates, 1988).

El VPI-3 está ampliamente distribuido en el mundo. Se han identificado cepas en humanos y en bovinos que causan enfermedad del tracto respiratorio (Klippmark y col., 1990). La oveja también es afectada por este virus (Davies y col., 1977; Robinson, 1983), el cual se ha aislado en muchos países incluyendo Chile (Berríos y col., 1991). Sin embargo, no hay información disponible acerca de las relaciones antigénicas entre las cepas del virus bovino y ovino.

Los síntomas incluyen temperatura elevada, anorexia, apatía, exudado nasal, respiración dificultosa, estornudos y tos. Macroscópicamente, en los lóbulos apicales del pulmón se observan zonas de coloración rojiza y de hepatización (Cutlip y Lehmkühl, 1982; Lehmkühl y Cutlip, 1982, 1983).

Según Welliver y Ogra (1988), los mecanismos defensivos del sistema respiratorio incluyen: filtración aerodinámica, transporte mucociliar, células "natural killer", macrófagos alveolares, anticuerpos, neutrófilos, sustancias de amplificación y tejido linfóide; organizado este último como nódulos linfáticos mediastinales, nódulos de tejido linfóide asociado a los bronquiolos (TLAB), acúmulos linfoides intersticiales y linfocitos libres en el parénquima y espacios aéreos.

El ataque del VPI-3 a la superficie de la célula es mediado por la glicoproteína HN, la cual interactuaría con la célula blanco (Van Wyke Coelingh y col., 1990), a través de receptores que probablemente corresponden a ácido neuroamínico contenido en las glicoproteínas de la superficie (Moscona y Peluso, 1992). Los receptores se encuentran en diferentes tipos celulares, como células epiteliales, linfoides, monocíticas, cerebrales y pulmonares (Vainionpaa y col., 1989).

De la proteína F depende la penetración del ARN viral a la célula huésped y la unión entre las células infectadas y no infectadas; esta proteína necesita una división, proteolítica para ser activa ya que, sin esta división las partículas virales producidas no son infecciosas y la infección se autolimita. La falla en la división de la proteína F podría ser un factor que contribuya al establecimiento de la persistencia viral (Vainionpaa y col., 1989).

Tanto las células epiteliales como los macrófagos son las primeras células que son infectadas por el VPI-3 (Chanock y McIntosh, 1990). Estas células son destruidas como consecuencia de la replicación viral y de la citotoxicidad de mediación

immune. Los macrófagos que no son destruidos pueden presentar diversas alteraciones funcionales (Davies y col., 1986).

Como consecuencia de la infección, en el tracto respiratorio se produce la pérdida del movimiento ciliar, el desprendimiento de las células epiteliales y la acumulación de exudado, facilitando así la colonización y el crecimiento bacteriano (Davies y col., 1986).

MATERIAL Y MÉTODO

1. MATERIAL

Muestras: Se trabajó con muestras de 10 pulmones neumónicos de corderos pesquisados en la Planta Faenadora de Carnes Lo Valledor de la Región Metropolitana. Las muestras seleccionadas fueron de aquellos pulmones que resultaron negativos a aislamiento de *Pasteurella haemolytica*, *Mycoplasma* u otra bacteria patógena y que al mismo tiempo fueron positivas a aislamiento de VPI-3, realizado en los laboratorios de Microbiología y Virología, respectivamente, de la Facultad de Cs. Veterinarias y Pecurias de la Universidad de Chile. El aislamiento bacteriano se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Biberstein y Thomson (1966). El aislamiento viral se realizó según procedimiento descrito por Berríos y col. (1991). Como control se usaron 2 pulmones que al examen macroscópico e histológico no presentaron lesiones.

Anticuerpos: Se usaron anticuerpos monoclonales murinos anti VPI-3, 4795 y 4673 que reconocen proteínas HN y F, respectivamente, del VPI-3 humano y reaccionan en forma cruzada con el VPI-3 bovino (Klippmark y col., 1990). Fueron cedidos gentilmente por el Dr. Robert Rydbeck, Departamento de Virología, Instituto Karolinska, Estocolmo, Suecia. También se utilizó suero policlonal anti VPI-3 elaborado en conejos. Anticuerpos IgG de burro, anti IgG de ratón o conejo, conjugados con fosfatasa alcalina (1198661 Boehringer, W. Germany) fueron utilizados para visualizar la formación de complejos entre el anticuerpo monoclonal o el suero policlonal y los antígenos reconocidos.

2. MÉTODO

De cada pulmón sano y neumónico se tomaron muestras que fueron divididas en dos trozos, uno se fijó en formalina al 10% neutralizada con carbona-

to de calcio para histopatología y el otro se congeló a -70°C para inmunohistoquímica.

Las muestras fijadas en formalina fueron incluidas en bloques de parafina según técnica estándar y se sometieron a las siguientes tinciones (López y col., 1980): técnica corriente de hematoxilina-eosina para ver morfología general, tricrómico de Van Gieson para identificar fibras colágenas tipo I y diferenciarlas de tejido muscular liso, y tinción Giemsa para reconocer células leucocitarias.

Las muestras congeladas se mantuvieron a -70°C hasta el momento de realizarse cortes de $6\ \mu\text{m}$ de grosor en un criomicrotomo (Lipshaw MFG. Co. Detroit 10, Michigan, USA). Los cortes obtenidos fueron fijados por 5 minutos en una solución de 80% de acetona con 20% de solución salina, enfriada previamente a -20°C . Posteriormente, estas muestras fueron sometidas a la técnica de inmunofosfatasa alcalina con anticuerpos monoclonales o suero policlonal de conejo anti VPI-3.

Inmunofosfatasa alcalina: Esta técnica inmunohistoquímica se realizó tanto en cortes de muestras fijadas en formalina e incluidas en parafina como en muestras congeladas de acuerdo al siguiente protocolo: los cortes fueron adheridos a cubreobjetos redondos, previamente cubiertos con polylisina al 1%, y se secaron al aire por 30 minutos. Se lavaron dos veces durante 10 minutos cada vez, en "buffer" Tris/Salino y una vez por 10 minutos en "buffer bloqueador" para fosfatasa alcalina. Luego, las secciones se incubaron en $50\ \mu\text{l}$ con los anticuerpos monoclonales o suero policlonal una hora a temperatura ambiente. Paralelamente se usaron controles negativos para la reacción inmunohistoquímica mediante la incubación de cortes con suero normal de ratón en lugar de los anticuerpos monoclonales correspondientes. Pasado el período de incubación, las secciones se enjuagaron 3 veces por 5 minutos cada vez, con solución buffer Tris/Salino. Luego, se incubó con $50\ \mu\text{l}$ de conjugado: se utilizó una dilución 1:200, en solución salina de IgG de burro anti IgG de ratón o conejo conjugada con fosfatasa alcalina. Transcurridos 30 minutos de la reacción se lavó 3 veces por 5 minutos cada vez con solución "buffer bloqueador". Posteriormente, se agregó $100\ \mu\text{l}$ de solución sustrato para fosfatasa alcalina, dejándose en un lugar sin luz por 5 minutos para permitir la reacción. Para detener este proceso se lavó con solución Tris/Salina por 2 minutos, luego con agua destilada por otros 2 minutos y se contratiñeron los núcleos con hematoxilina diluida 1:10 por 30 segundos o con verde de me-

tilo al 0,5% en solución acuosa. Se montó el portaobjeto con gelatina en fase líquida a 60°C y se dejó solidificar a temperatura ambiente. Finalmente, se procedió a analizar y fotografiar las preparaciones en microscopio de luz, marca Nikon modelo Labophot, que incluye una cámara de la misma marca. Para la fotografía se usó película Agfachrome CT100i. La reacción positiva se visualiza por la aparición de un color rojo.

Análisis de resultados: Los resultados obtenidos de las muestras procesadas se analizaron mediante:

- Análisis histológico descriptivo de los pulmones infectados.
- Análisis comparativo entre los diferentes pulmones infectados y los controles, expresados mediante tablas con cruces que indican la localización y cantidad aproximada de células positivas, donde:
una cruz (+) = escasa cantidad
dos cruces (++) = moderada cantidad
tres cruces (+++) = abundante cantidad
- Recuento total de linfocitos por nódulos TLAB de pulmones sanos y enfermos. Para esto, se obtuvieron fotografías de las preparaciones histológicas en un microscopio Nikon, modelo Labophot II, las cuales a su vez fueron digitalizadas en un escáner para ser procesadas y amplificadas, mediante el software MSPaint, para facilitar recuento total de linfocitos por nódulo de TLAB.

RESULTADOS

Examen macroscópico: La principal lesión consistió en áreas de consolidación. Estas áreas, que eran de color rojo pálido y atelectásicas, eran de diferente grado de extensión afectando a la porción anteroventral de lóbulos anteriores. Al corte presentaban pequeños focos grises y seguían el recorrido de pequeños bronquios y bronquiólos. Los nódulos linfáticos mediastinales, en los casos más severos, se presentaban hiperémicos y levemente aumentados de volumen.

Examen histopatológico: Los 10 pulmones neumónicos en estudio evidenciaron las siguientes lesiones, con algunas variaciones de intensidad: a nivel de los bronquiólos se observó que en el lumen resalta la presencia de masas organizadas de células epiteliales, macrófagos, neutrófilos y fibrina. En el epitelio se presenta necrosis y descamación, acompañada de vacuolización de muchas

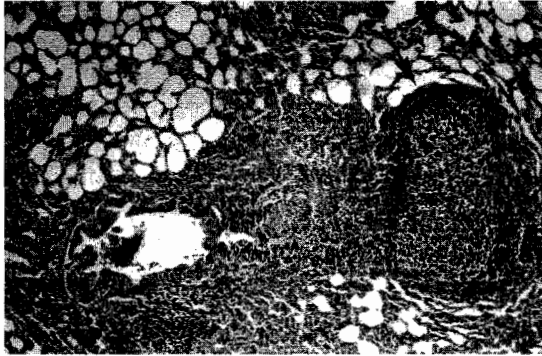


Figura N° 1. Corte de pulmón infectado con virus PI-3: se aprecia infiltración linfocitaria peribronquiolar con extensión a los alvéolos adyacentes y una marcada hiperplasia del tejido linfoide asociado al bronquiolo (flecha). En el lumen bronquiolar se presenta escaso exudado compuesto por neutrófilos, células epiteliales, macrófagos y fibrina. Tinción Giemsa. 40X.

Histological section of PIV-3 infected lung, peribronchiolar lymphocyte accumulation extending to adjacent alveoli and a marked hyperplasia of bronchiolar associated lymphoid tissue (BALT) (arrow) are shown. Inside the bronchiolar lumen there is scarce exudate containing neutrophils, epithelial cells, macrophages and fibrin. Giemsa Stain. 40X.

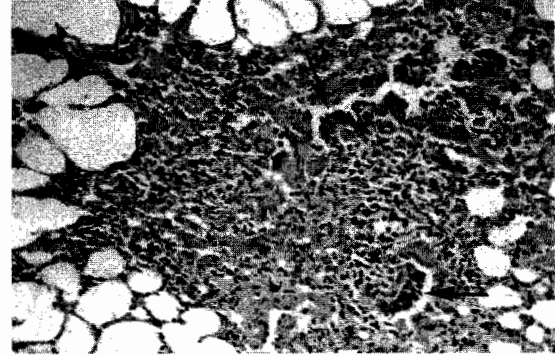


Figura N° 2. Corte de pulmón infectado con virus PI-3: se observa foco de colapso alveolar con engrosamiento de los tabiques interalveolares por infiltración linfocitaria y fibrosis. Numerosos focos de epitelizeación por proliferación de neumocitos tipo II (flecha). Tinción Van Gieson. 100X.

Histological section of PIV-3 infected lung, an area of alveolar collapse and interalveolar wall thickening due to lymphocyte accumulation and fibrosis, is observed. Several areas of epithelization, this is, pneumocytes type II proliferation are present (arrow). Van Gieson Stain. 100X.

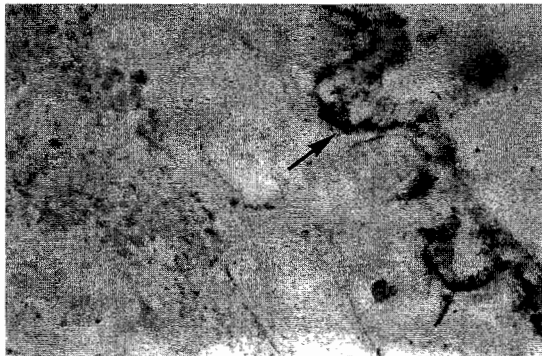


Figura N° 3. Corte congelado de pulmón infectado con virus PI-3: se observa reacción positiva (color rojo) a virus PI-3 en la membrana y en el citoplasma de las células del epitelio bronquiolar (flecha). Tinción con anticuerpos monoclonales anti VPI-3. Inmunofosfatasa alcalina indirecta, contratinción nuclear con verde metilo. 100X.

Frozen section of PIV-3 infected lung. Positive reaction (red color) to PIV-3 particle detection on the membrane and cytoplasm of bronchiolar epithelial cells (arrow). Indirect immune alkaline phosphatase staining with monoclonal antibodies anti VPI-3. Nuclear counterstain with Methyl green. 100X.

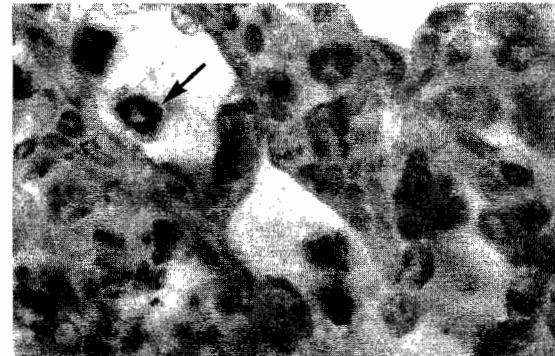


Figura N° 4. Corte congelado de pulmón infectado con virus PI-3: se observa reacción positiva (color rojo) a virus PI-3 en la membrana y en el citoplasma de las células del epitelio alveolar y en macrófagos alveolares (flecha). Tinción con anticuerpos monoclonales anti VPI-3. Inmunofosfatasa alcalina indirecta, contratinción nuclear con verde metilo. 100X.

Frozen section of PIV-3 infected lung. Positive reaction (red color) to PIV-3 particle detection on the membrane and cytoplasm of alveolar epithelial cells and alveolar macrophages (arrow). Indirect immune alkaline phosphatase staining with monoclonal antibodies anti VPI-3. Nuclear counterstain with Methyl green. 100X.

células epiteliales, a veces con inclusiones citoplásmicas eosinófilas de ubicación basal. En la pared bronquiolar se presenta una moderada fibrosis, determinada por la presencia de fibras de colágeno tipo I y fibroblastos, formando 2 o 3 capas concéntricas. Llama la atención una marcada hiperplasia del tejido linfoide asociado a bronquíolos (Fig. 1), constituyendo un notorio aumento de tamaño de estas estructuras respecto a pulmones controles sanos. En la mayoría de los casos se presenta una marcada infiltración linfocitaria peribronquiolar con extensión a los alvéolos adyacentes (Fig. 1). En los cortes de pulmones sanos se determinó un promedio de 1.307 células (1.205 a 1.480 células) por nódulo de TLAB, en cambio en los cortes de pulmones infectados con virus VPI-3 se contabilizó un promedio de 4.788 células por nódulo (4.390 a 4.930 células). A nivel alveolar se apreció engrosamiento de los tabiques interalveolares y a veces zonas de atelectasia (Fig. 2). Se detectaron focos aislados de epitelización alveolar, que corresponden a proliferación de neumonitos tipo II (Fig. 2). Mediante la técnica de Van Gieson se vio que el engrosamiento de las paredes alveolares observado con la tinción de hematoxilina-eosina correspondía principalmente a proliferación de fibras colágenas tipo I y a la presencia de macrófagos y linfocitos (Fig. 2).

También se apreció intensa congestión e hipermia de los vasos sanguíneos, edema interlobulillar con dilatación de los vasos linfáticos e infiltración perivascular. La pleura se encontró engrosada por proliferación de fibras colágenas tipo I y con infiltración linfocitaria. Con la tinción de Giemsa se demostró la presencia de linfocitos, plasmocitos y macrófagos en las áreas de engrosamiento de paredes alveolares, de la pleura, en áreas de infiltración peribronquiolar y perivascular y en el intersticio pulmonar. En Tabla N° 1 se puede observar la distribución de las células leucocitarias en cortes de pulmones controles, negativos a VPI-3, donde los linfocitos sólo se observan en la zona peribronquiolar, en cambio los macrófagos se pueden ver en la zona peribronquiolar y en la pared y espacio alveolar. Por otro lado, no se observan células polimorfonucleares (PMN) en ninguna zona. En la misma tabla se muestra la distribución de las células leucocitarias en los cortes de pulmones infectados con VPI-3. Los linfocitos aumentan considerablemente en la zona peribronquiolar; además aparecen en la pared alveolar y en el espacio interlobulillar. La distribución de los macrófagos es similar a la descrita en los controles, con la diferencia que tam-

bién se observan macrófagos en el lumen bronquiolar. En estos cortes, a diferencia de los cortes de pulmones controles, aparecen PMN neutrófilos en el lumen bronquiolar y en el espacio alveolar.

Detección *in situ* del VPI-3 en lesiones pulmonares: Se intentó detectar partículas de VPI-3, mediante inmunohistoquímica, en cortes de tejido fijado en formalina y embebido en parafina. Con los anticuerpos monoclonales antiproteínas de VPI-3 no se observó reactividad, pero se obtuvo inmunotinción positiva con antisuero policlonal preparado en conejo, aunque ésta resultó más leve al compararla con la obtenida en cortes de tejido congelado.

La Tabla 2 resume los resultados obtenidos al analizar los cortes de tejido congelado inmunoteñidos con fosfatasa alcalina indirecta (FAI) y anticuerpos monoclonales. En algunos cortes de pulmón neumónico teñidos con FAI había reacción positiva (color rojo) en la membrana celular y citoplasma de una gran proporción de células epiteliales bronquiolares (Fig. 3). En menor proporción, algunos macrófagos, en el espacio alveolar, junto a células descamadas del epitelio alveolar también presentaban reacción positiva. Sin embargo, en otras secciones, la tinción positiva de células epiteliales bronquiolares era más bien reducida, mientras había más reacción en células de la pared alveolar con más macrófagos positivos (Fig. 4). No se detectó reactividad en endotelio, fibroblastos, linfocitos ni otro tipo celular del tejido pulmonar.

DISCUSIÓN

Mediante microscopia de luz se observó que las lesiones histopatológicas presentes en las muestras de tejido pulmonar ovino infectadas con VPI-3 son concordantes a una neumonía broncointersticial, donde destaca la vacuolización de células epiteliales bronquiolares con escasas inclusiones citoplásmicas eosinófilas, aumento de neumocitos tipo II en la pared alveolar, fibrosis de la pared alveolar con presencia de macrófagos y linfocitos. La lesión más destacada corresponde a una marcada hiperplasia de los nódulos de TLAB.

En este estudio la presencia del virus parainfluenza tipo 3 y su relación con la proliferación y distribución de linfocitos pulmonares, fueron estudiados satisfactoriamente empleando el método inmunohistoquímico de fosfatasa alcalina indirecta. Este método, a diferencia de la inmunofluorescencia

TABLA 1
HALLAZGOS HISTOPATOLÓGICOS EN PULMONES OVINOS POSITIVOS A AISLAMIENTO
DE VPI-3 Y CONTROLES NEGATIVOS

HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS IN OVINE LUNGS BOTH POSITIVE TO PIV-3 ISOLATION AND NEGATIVE CONTROLS

<i>Zonas</i>	<i>Pulmones neumónicos</i>		<i>Pulmones controles</i>
ZONA PERIBRONQUIOLAR	Linfocitos	+++	+
	PMNs	++	-
	Mφs	++	+
LUMEN BRONQUIOLAR	detritus celulares	+	-
	Linfocitos	+++	-
	PMNs	++	-
	Mφs	++	-
TLAB	Hiperplasia	++	-
ESPACIO ALVEOLAR	células epiteliales	++	-
	Linfocitos	+	-
	PMNs	-	-
	Mφs	++	+
	Atelectasia	+++	-
	Enfisema	++	-
PARED ALVEOLAR	≠ grosor septal	++*	-
	Fibrosis	+	-
	Epitelización	+	-
	Linfocitos	++	-
	PMNs	-	-
	Mφs	++	+
ESPACIO INTERLOBULILLAR	Edema	+	-
	Linfocitos	+	-
	PMNs	+	-
	Mφs	+	-
PLEURA	≠ grosor	+	-
	Linfocitos	+	-
	PMNs	+	-
	Mφs	+	-
	Fibrosis	+	-
VASOS SANGUÍNEOS	Hiperemia	+++	-
	manguitos linfocíticos	+	-

* Los cambios se expresan de acuerdo a la frecuencia de presentación:

- = ausente

+ = escaso

++ = moderado

+++ = frecuente

PMNs = Polimorfonucleares neutrófilos

Mφs = Macrófagos

TLAB = Tejido linfoide asociado a bronquiólos.

TABLA 2
 DISTRIBUCIÓN DE LAS PARTÍCULAS DE VPI-3 EN CORTES CONGELADOS DE PULMONES OVINOS NEUMÓNICOS, DETECTADAS POR INMUNOFOSFATASA ALCALINA INDIRECTA CON ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-VPI-3

PIV-3 PARTICLES DISTRIBUTION IN FROZEN SECTIONS OF OVINE PNEUMONIC LUNGS, DETECTED BY INDIRECT IMMUNE ALKALINE PHOSPHATASE WITH ANTI-PIV-3 MONOCLONAL ANTIBODIES.

Área histológica	Pulmones neumónicos		Pulmones controles
BRONQUIÓLOS	Epitelio	++*	-
	Linfocitos	-	-
	Mφs	++	-
TLAB	linfocitos	-	-
	Mφs	-	-
PARED ALVEOLAR	epitelio	++	-
	linfocitos	-	-
	Mφs	++	-
ESPACIO ALVEOLAR	Cél. epiteliales	+	-
	linfocitos	-	-
	Mφs	+	-

* Los cambios se expresan de acuerdo a la frecuencia de presentación:

- = ausente
- + = escaso
- ++ = moderado
- +++ = frecuente
- Mφs = Macrófagos
- TLAB = Tejido linfoide asociado a bronquiólos.

cia, no requiere de un microscopio especialmente equipado para la observación de los resultados y las muestras en estudio pueden ser conservadas en forma indefinida. Además, los cortes de tejidos pueden ser sometidos a tinciones nucleares que permiten distinguir muy claramente detalles de la arquitectura tisular.

Mediante el estudio inmunohistoquímico se detectaron partículas de VPI-3 en el epitelio de la pared alveolar, en macrófagos alveolares e intersticiales y en células ciliadas bronquiolares. Esto concuerda con lo observado en terneros, mediante microscopía electrónica de transmisión, por Tsai, (1977) y Brysson y col. (1983). Las células epiteliales alveolares en las que se detectaron antígenos virales por inmunotinción posiblemente correspondan en su mayoría a neumocitos tipo II, ya que según las características histopatológicas, las lesiones corresponderían a un proceso infeccioso de curso intermedio, en el cual predominan estas células (Brysson y col., 1983). Además, ya se ha demostra-

do que los paramyxovirus infectan y se replican con mayor facilidad en los neumocitos tipo II (Castleman y col., 1989).

La moderada presencia de antígenos virales en células epiteliales bronquiolares, observada en algunos casos, podría explicarse por la intensa regeneración del epitelio que se estaba produciendo en el momento del estudio. Esta observación es concordante con lo descrito por Brysson y col. (1983) en estudios de microscopía electrónica, donde las partículas virales encontradas en células epiteliales bronquiolares también fueron escasas durante la misma fase de la infección. Además, tanto en estos estudios como en el presente trabajo no se detectó la presencia de antígenos virales en células endoteliales pulmonares.

La presencia de PMN neutrófilos en el lumen bronquiolar y bronquiolar es típica en lesiones de neumonía broncointersticial, ya que ellas representan la acción combinada de virus-bacteria, y que según Yates (1988) estos PMN son el componente

exudativo asociado a la acción bacteriana. El aumento de macrófagos intersticiales y alveolares que se observan en las áreas de tejido lesionado por efecto del VPI-3 demostraría la participación de estas células en los mecanismos patogénicos y de defensa durante esta infección viral. Sin embargo, sólo en una pequeña proporción de macrófagos se detectó el VPI-3, lo que podría deberse a que los macrófagos alveolares se pierden por el tratamiento a que son sometidas las muestras, y los macrófagos intersticiales, que son los más observados, podrán cursar una infección viral persistente, con lo cual no se estaría presentando el antígeno en su superficie. Esto concuerda con lo descrito por Tsai (1977) y Brysson y col. (1983). En las lesiones pulmonares estudiadas se observó regeneración tisular representada como un incremento de la población de fibroblastos en las paredes alveolares, bronquiolares, lo que explicaría el engrosamiento de esas paredes observado en los cortes positivos a VPI-3. Esto sería coincidente con lo descrito por Crouch (1990) para explicar los eventos de la fibrosis pulmonar. Por lo tanto, la infección por VPI-3 en ovinos produciría lesiones histopatológicas compatibles con una fibrosis pulmonar, en grado variable según la severidad del proceso infeccioso.

Al utilizar los sueros anti VPI-3, la reacción mediante técnicas inmunohistoquímicas en cortes fijados en formalina e incluidas en parafina fue menos intensa que en cortes de tejido congelado. Más aún, no hubo reacción de los anticuerpos monoclonales con cortes fijados con formalina. Esto podría deberse a un enmascaramiento o a una desnaturalización de proteínas producidas por la formalina y/o la temperatura usada, lo cual impediría el reconocimiento de los epitopes detectados por los anticuerpos; esto es particularmente crítico en el caso de los anticuerpos monoclonales, que reconocen solamente un epitope.

La acumulación de linfocitos en el intersticio pulmonar en la infección con VPI-3 encontrada en la presente investigación se debería a una retención y/o proliferación linfocitaria en respuesta a secreción de citoquinas, o a la presencia de antígenos virales, y así estas células contribuirían a producir las lesiones aquí descritas. Lo que concuerda con Watt y col. (1992) quienes sugieren que la reacción en los nódulos linfáticos puede ser conducida por antígenos solubles drenados a estos nódulos, por antígenos transportados por células desde los tejidos infectados o por algún otro evento tal como una expresión alterada de citoquinas.

RESUMEN

Aspectos patológicos de la infección pulmonar por virus parainfluenza tipo 3 (VPI-3) en la oveja fueron investigados en primer lugar detectando *in situ* partículas virales en casos de neumonía ovina, negativos a aislamiento bacteriológico pero positivos a aislamiento de VPI-3; en segundo lugar por medio de la caracterización de lesiones asociadas mediante estudio macroscópico e histopatológico. Las partículas de VPI-3 fueron detectadas mediante inmunotinción con fosfatasa alcalina indirecta con anticuerpos monoclonales y suero policlonal de conejo.

La principal lesión macroscópica consistió en áreas de consolidación, las cuales mostraban una coloración café rojiza y contenían pequeños focos grisáceos al corte. Estas áreas estaban confinadas solamente a los lóbulos anteriores de los pulmones. Estas áreas de consolidación, al corte, se distribuían difusamente a través de los lóbulos afectados y parecían seguir los bronquios más pequeños y bronquiólos. Los nódulos linfáticos mediastinales y bronquiolares estaban hiperémicos y levemente aumentados. Los hallazgos histopatológicos correspondieron a neumonía intersticial con hiperplasia de tejido linfoide asociado a bronquiólos (TLAB), cambios degenerativos del epitelio bronquiolar con infiltración linfocítica, áreas de atelectasia y aumento del grosor de la pared alveolar debido a proliferación de neumocitos tipo II, linfocitos, macrófagos y a fibrosis. Las partículas virales, detectadas en cortes congeladas con anticuerpos monoclonales antiproteínas de VPI-3, fueron observadas más frecuentemente en el epitelio bronquiolar que en células del epitelio alveolar y ocasionalmente en macrófagos. El gran número de linfocitos, combinado con una citólisis mínima a moderada de las células que presentaban antígeno viral, sugiere que las lesiones inducidas por VPI-3 tienen un componente inmunopatológico.

BIBLIOGRAFÍA

- BERRÍOS, P.; CELEDÓN, O., LORCA, L. 1990. *Caracterización de dos cepas del virus parainfluenza-3 aisladas de bovinos con problemas respiratorios*. Arch. Med. Vet. 22: 169-174.
- BERRÍOS, P.; GONZÁLEZ, C.; ENCISO, J., SANTIBÁÑEZ, M. 1991. *Aislamiento del virus parainfluenza tipo 3 en ovinos con neumonía*. Comunicación preliminar. Av. Cs. Vet. 6: 195-196.
- BIBERSTEIN, E. L., THOMSON, D. A. 1966. *Epidemiological studies on Pasteurella haemolytica in sheep*. J. Comp. Path. 76: 83-94.

- BRYSSON, D. G.; MCNULTY, M. S.; MCCRACKEN, R. M., CUSH, P. F. 1983. *Ultrastructural features of experimental parainfluenza type 3 virus pneumonia in calves*. J. Comp. Path. 93: 397-414.
- CASTLEMAN, W. L.; NORTHROP, P. J., MCALLESTER, P. K. 1989. *Replication of parainfluenza (sendai) virus in isolates rat pulmonary type II alveolar epithelial cells*. Am. J. Pathol. 134: 1135-1142.
- CROUCH, E. 1990. *Pathobiology of pulmonary fibrosis*. Am. J. Physiol. 259: 159-184.
- CUTLIP, R. C., LEHMKUHL, H. D. 1982. *Experimentally induced parainfluenza type 3 virus infection in young lambs: Pathologic response*. Am. J. Vet. Res. 43: 2101-2107.
- CHANOCK, R. M. y MACINTOSH, K. 1990. *Parainfluenza Viruses*. In: Virology Edits. Field, B.N. y Knipe, D.M. pp. 963-988. Edit. Raven Press, New York.
- DAVIES, S.; DUNGWORTH, D.C.; HUMPHREYS, S., JOHNSON, J. 1977. *Concurrent infection of lambs with parainfluenza virus type 3 and Pasteurella haemolytica*. N. Z. Vet. J. 25: 263-265.
- DAVIES, D. H.; LONG, D. Y.; MCCARTHY, A. R., HERCEG, M. 1986. *The effect of parainfluenza virus type 3 on the phagocytic cell response of the ovine lung to Pasteurella haemolytica*. Vet. Microbiol. 11:125-144.
- DIMOCK K., COLLINS PI. 1993. *Rescue of synthetic analogs of genomic RNA and replicative-intermediate RNA of human parainfluenza virus type 3*. J. Virol. 67: 2772-2778.
- KLIPPMARK, E.; RYDBECK, R.; SHIBUTA, H., NORBY, E. 1990. *Antigenic variation of human and bovine parainfluenza virus type 3 strains*. J. Gen. Virol. 71: 1577-1580.
- LEHMKUHL, H. D., CUTLIP, R. 1982. *Characterization of parainfluenza type 3 virus isolated from the lung of a lamb with pneumonia*. Am. J. Vet. Res. 43: 626-628.
- LEHMKUHL, H. D., CUTLIP, R. C. 1983. *Experimental parainfluenza type 3 infection in young lambs: clinical, microbiologic and serological response*. Vet. Microbiol. 8: 437-42.
- LÓPEZ, M.; LEYTON, C., GRAFF, M. 1980. *Técnicas de histología y citología*. Universidad de Chile. Facultad de Medicina. Chile. 242 p.
- MOSCONA A. y PELUSO R. 1992. *Fusion properties of cells infected with human parainfluenza virus type 3: receptor requirements for viral spread and virus-mediated membrane fusion*. J. Virol. 66: 6280-6287.
- ROBINSON, R. 1983. *Respiratory Disease of Sheep and Goats*. Vet. Clin. North. Am.: Large Animal Practice. 5: 539-555.
- TSAI, K. S. 1977. *Replication of parainfluenza type 3 virus in alveolar macrophages: Evidence of in vivo infection and of in vitro temperature sensitivity in virus maturation*. Infection and Immunity. 18: 780-791.
- VAINIONPAA, R.; MARUSYK, R. y SALMI, A. 1989. *The Paramyxoviridae: aspects of molecular structure, pathogenesis and immunity*. Adv. Virus Res. 37: 211-242.
- VAN WYKE COELINGH, K. L.; WINTER, C. C.; TIERNEY, E. L.; HALL, S. L.; LONDON, W.T.; KIM, H.W.; CHANOCK, R.; MURPHY, B. R. 1990. *Antibody responses of humans and nonhuman to individual antigenic sites of the haemagglutinin-neuraminidase and fusion glycoproteins after primary infection or reinfection with parainfluenza type 3 virus*. J. Virol. 64: 383-43.
- WATT, N. J.; MACINTYRE, N.; COLLIE, D.; SARGAN, D.; MCCONNELL, I. 1992. *Phenotypic analysis of lymphocyte populations in the lungs and regional lymphoid tissue of sheep naturally infected with maedi visna virus*. Clin. Exp. Immunol. 90: 204-208.
- WELLIVER, R. C. y OGRA, P. L. 1988. *Immunology of respiratory viral infections*. Ann Rev. Med. 39: 147-162.
- YATES, W. D. 1988. *Respiratory System*. In: *Special Veterinary Pathology*. Thompson, R. G. Edit. B. C. Decker Pub. Toronto, p. 69.