

Alteraciones de la concentración de leucocitos y subpoblaciones de linfocitos de cerdos que sobrevivieron al desafío con el virus de la fiebre porcina clásica

Angel Martínez Sosa*
Isabel Cisneros Morales*
Dolores González Vega*
Camila Arriaga Díaz*
Antonio Morilla González*

Resumen

La infección con el virus de la fiebre porcina clásica (FPC) provoca la disminución de todas las subpoblaciones de leucocitos circulantes y una inmunosupresión marcada en los cerdos que se enferman y mueren. Sin embargo, no se ha informado del efecto del virus sobre los leucocitos circulantes en cerdos que sobreviven a la infección. Con objeto de conocer este efecto se estudiaron 6 cerdos que, después de ser desafiados experimentalmente con el virus de la FPC, desarrollaron la enfermedad, pero posteriormente se recuperaron. Los parámetros evaluados en estos cerdos fueron los signos clínicos, la temperatura rectal, la biometría hemática y las subpoblaciones de linfocitos determinadas por rosetas de eritrocitos. Los resultados mostraron que hubo un incremento en la temperatura rectal desde el día siete hasta el día doce posinoculación, asociada a anorexia, decaimiento y diarrea ligera. En los primeros siete días hubo una disminución marcada de la concentración de leucocitos totales, linfocitos, leucocitos polimorfonucleares segmentados y en banda, monocitos, linfocitos T totales (TE), T de alta afinidad (Taa), B con receptor fc (Bfc) y Null. Al mismo tiempo, se observó un incremento de T autólogos (Taut), que son células inmaduras, y no hubo alteración de los linfocitos B con receptor de complemento (Bc). Sin embargo, a partir del séptimo día se incrementaron los valores de la mayoría de las células y disminuyeron los Taut. Estos resultados indican que la recuperación de los animales estuvo asociada al incremento de los leucocitos circulantes.

Introducción

El virus de la fiebre porcina clásica (FPC) se multiplica en células del sistema reticuloendotelial, y provoca inmunosupresión, la que se manifiesta en un aumento de la morbilidad y mortalidad de los cerdos.^{6,11} Cuando se inoculan cerdos susceptibles con cepas patógenas, los animales que mueren presentan una disminución marcada de todas las células leucocitarias sanguíneas (incluidas las diferentes subpoblaciones de linfocitos), reducción de la concentración de linfocitos en los órganos linfoides, ligera modificación de la fagocitosis de los leucocitos circulantes, inhibición de la respuesta de los linfocitos T y B a mitógenos en pruebas de transformación blastoide y anergia a la respuesta intradérmica a mitógenos. Todo esto indica que los animales sufren alteraciones severas en el sistema nervioso inmune.^{3,4,8,12,13,15,17} En ocasiones, hay animales que desarrollan levemente la enfermedad y sobreviven al desafío, lo que sugiere que algunos cerdos poseen resistencia individual.¹¹ No se conocen las razones por las que algunos animales son resistentes a una infección experimental o natural, o por qué pueden llegar a enfermar y luego recuperarse. En brotes de campo se ha encontrado una letalidad entre el 40% y el 50%;^{4,9} los animales que se recuperan tienen menor peso corporal y se tornan más susceptibles a otras enfermedades que los cerdos sanos, lo que sugiere que el virus altera la fisiología del animal. La resistencia de los cerdos en el campo se debe a diversos factores tales como la presencia de cepas de FPC con diferentes grados de virulencia y al hecho de que algunos cerdos poseen inmunidad natural o adquirida, ya sea por haber sido expuestos al virus de campo o vacunal, o por haber recibido inmunidad materna.

En un trabajo anterior se demostró que la infección aguda provocó la eliminación de todas las subpoblaciones leucocitarias en cerdos que murieron.⁸ Continuando esta línea de investigación, en este trabajo se analizaron los cambios en las concentraciones de subpoblaciones leucocitarias circulantes de animales

Recibido para su publicación el 7 de febrero de 1994.

* Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias-Microbiología, INIFAP-SARH; Departamento de Inmunología, km 15.5 Carretera México-Toluca, Palo Alto, Cuajimalpa, 05110, México, D.F.

que se enfermaron, pero sobrevivieron a una infección experimental con una cepa patógena de FPC; los resultados se relacionaron con los signos clínicos presentados por estos animales.

Material y métodos

Animales. Se utilizaron 6 cerdos híbridos de 45 días de edad de aproximadamente 10 kg de peso, susceptibles al virus de la FPC. Estos cerdos eran susceptibles y sobrevivieron al virus patógeno con que fueron desafiados.

Virus de desafío. Cada cerdo fue inoculado con 2 ml de la cepa patógena Lederle con un título de 1×10^6 DL/ml.

Temperatura corporal. Después de la inoculación, se tomó la temperatura rectal a cada animal, diariamente a la misma hora durante 14 días.

Obtención de muestras de sangre. Los animales fueron sangrados de la vena yugular antes de la inoculación del virus de la FPC, y posteriormente cada tercer día durante 14 días.

Biometría hemática. Se obtuvo sangre heparinizada de la vena yugular y se realizó la biometría hemática, siguiendo los métodos convencionales.²

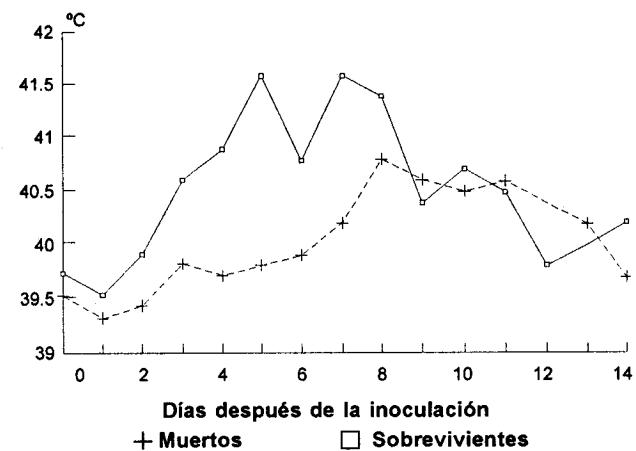
Purificación y caracterización de linfocitos. Para la obtención de linfocitos y la identificación de las subpoblaciones se siguieron las técnicas descritas anteriormente.^{5,8}

Todos los valores fueron analizados estadísticamente por medio de la prueba "t" de Student.²⁰

Resultados

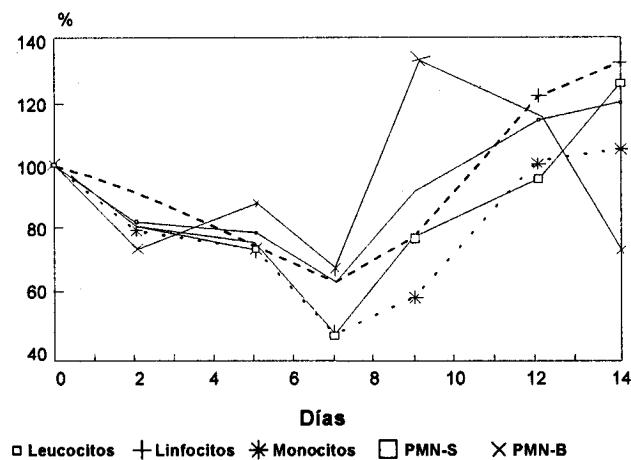
Los animales utilizados en este estudio desarrollaron fiebre, anorexia, apatía, diarrea ligera y mala condición corporal a partir del séptimo día después de la infección con el virus de FPC, pero se recuperaron en un lapso de aproximadamente siete días. En la Figura 1 se muestra el promedio de la temperatura rectal de estos cerdos, comparado con el promedio de temperatura de un grupo de animales que murieron. El valor más elevado (41°C) se observó a los 8 días posinfección, pero empezó a disminuir a partir de los 12 días, hasta llegar a valores normales 14 días después de la infección; en tanto que en el grupo que murió hubo fiebre desde el tercer día posinoculación, que continuó hasta poco antes de morir.

En el Cuadro 1 se presentan los valores absolutos de la concentración de leucocitos y de las subpoblaciones de linfocitos T, B y Null antes del desafío y a los 2, 5, 7, 8, 12 y 14 días posinfección. Los valores basales obtenidos se encuentran dentro del rango considerado normal en la literatura.^{2,5,7,18,19,21} Con objeto de mostrar las tendencias, los resultados se graficaron en las Figuras 2, 3 y 4 como el porcentaje de cambio (delta %) en relación con el valor basal, tomando éste como el 100%. Como resultado de la infección se



Cada punto representa el promedio de 6 cerdos que fueron inoculados el día 0 con la cepa patógena Lederle y sobrevivieron, y 6 cerdos que murieron después del día 14

Figura 1. Promedio de la temperatura rectal de cerdos que murieron o sobrevivieron después de un desafío con el virus de la FPC.



Cada punto representa el promedio de 6 cerdos que fueron inoculados el día 0 con la cepa patógena Lederle y sobrevivieron. Las diferencias estadísticas se encuentran en el Cuadro 1. Leucocitos polimorfonucleares segmentados (S) o en la banda (B)

Figura 2. Porcentaje de cambio de leucocitos de cerdos que sobrevivieron a una inoculación con el virus de la FPC.

observó una marcada disminución en la concentración de la mayoría de las células durante los primeros siete días, pero posteriormente se incrementaron hasta llegar a valores semejantes o superiores a los basales, 14 días después. En el caso de los linfocitos Taut, hubo un incremento entre el segundo y el séptimo día, pero posteriormente disminuyeron. Los linfocitos Bc no mostraron cambio en la concentración durante los primeros 9 días, pero a partir de este momento se incrementaron.

Discusión

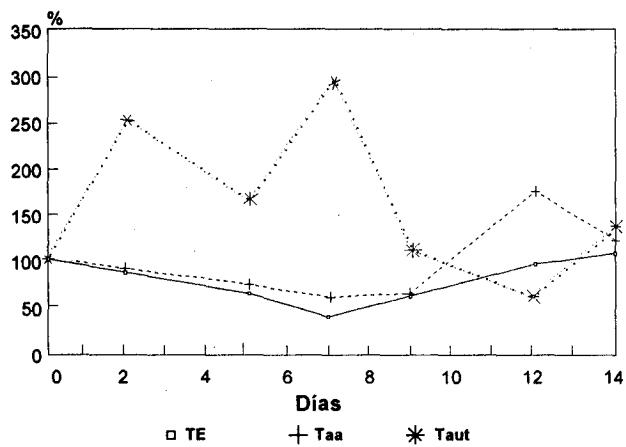
El virus de la FPC causa inmunosupresión, la cual se manifiesta en un aumento de las infecciones secun-

Cuadro 1
VALORES ABSOLUTOS EN mm³ DE LAS SUBPOBLACIONES CELULARES SANGUINEAS DE SEIS CERDOS
QUE SOBREVIVIERON AL DESAFIO CON EL VIRUS DE LA FIEBRE PORCINA CLASICA

Células	X	Días después de la inoculación						
		0	2	5	7	9	12	14
Leuc.	X	21550	17725	17092	13892	20175	25250	26525
	EE	2044a	1488a	2969b	1520b	3613a	3673a	3289b
Linf.	X	10741	9920	7967	7064	8514	13415	14560
	EE	1419a	789a	670a	852b	1521a	2178a	4278b
Mono.	X	1454	1159	1084	704	864	1502	1575
	EE	249a	77a	171a	92b	200b	227a	740a
PMN-S	X	2633	2127	2019	1236	2051	2586	3393
	EE	558a	592a	723a	537b	472a	619a	1159a
PMN-B	X	6559	4835	5824	4504	8843	7764	5127
	EE	1386a	752a	2148a	942a	2463a	1545a	1185a
TE	X	2992	2530	1877	1217	1855	2983	3350
	EE	384a	175a	500b	200b	312b	492a	660a
Taa	X	1438	1320	1061	860	965	2607	1825
	EE	157a	213a	353b	266b	195b	416b	592b
Taut	X	69	174	115	207	78	45	97
	EE	16a	73b	90b	95b	45a	40a	56a
Bfc	X	3149	2998	2520	2449	2305	3384	3624
	EE	478a	421a	295a	526a	543a	716a	843a
Bc	X	2197	2701	2199	2157	2401	4146	4481
	EE	439a	342b	168a	351a	413a	859b	1228b
Null	X	4607	4393	3570	3398	4354	7048	7587
	EE	754a	524a	484a	440a	988a	1238b	2885b

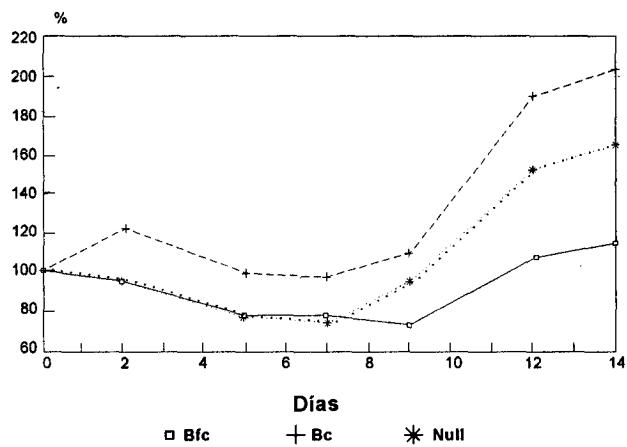
Leuc. = leucocitos; Linf. = linfocitos; Mono. = monocitos; PMN-S = polymorfonucleares segmentados; PMN-B = en banda; TE = linfocitos T totales; Taa = T de alta afinidad; Taut = T autólogos; Bfc = B con receptor fc; Bc = con receptor C3b; Null = linfocitos no T ni B.

X = promedio. EE = error estándar de 6 animales. Literales diferentes ($P < 0.05$) en relación con los valores del día 0.



Cada punto representa el promedio de 6 cerdos que fueron inoculados el día 0 con la cepa patógena Lederle y sobrevivieron. Las diferencias estadísticas se encuentran en el Cuadro 1.

Figura 3. Porcentaje de cambio de linfocitos T de cerdos que sobrevivieron a una inoculación con el virus de la FPC.



Cada punto representa el promedio de 6 cerdos que fueron inoculados el día 0 con la cepa patógena Lederle y sobrevivieron. Las diferencias estadísticas se encuentran en el Cuadro 1.

Figura 4. Porcentaje de cambio de linfocitos B y Null de cerdos que sobrevivieron a una inoculación con el virus de la FPC.

darias del tracto respiratorio y digestivo.¹¹ Recientemente se demostró que el virus patógeno provoca una disminución global de los leucocitos y linfocitos circulantes, sin que exista una eliminación selectiva de algunas de las subpoblaciones específicas definidas por rosetas, como los linfocitos TE, Taa, Taut, Bfc o Null, lo que indica que el virus tiene un efecto inespecífico radiomimético en el animal.⁸

En el presente trabajo se observó el mismo efecto inmunosupresor en los cerdos que se enfermaron y sobrevivieron, ya que también en ellos hubo una notable disminución en la concentración de la mayoría de las células, lo cual llegó a los valores más bajos al séptimo día posinfección. Sin embargo, a partir de este momento hubo una marcada recuperación de la concentración de las células sanguíneas en este grupo de animales. Por otro lado, la subpoblación de Taut, formada por linfocitos inmaduros,¹⁸ fue resistente al virus; se observó además, un incremento en el número de estos linfocitos durante los primeros 7 días de la infección, probablemente debido al reemplazo de las células T (TE y Taa) que fueron eliminadas. Tampoco se afectó la población Bc, lo que sugiere que, en las infecciones de FPC que llegan a ser controladas no todas las subpoblaciones de linfocitos son eliminadas, a diferencia de lo que sucede en los cerdos que mueren.⁸

No se conocen bien las causas de la eliminación de las células circulantes, aunque podría deberse a la multiplicación del virus de la FPC en células de la médula ósea, lo que quizás impida la formación de nuevas células; o bien destruya los leucocitos circulantes en forma directa o induzca la alteración de patrones de migración y su posterior destrucción en sitios como el hígado. También se ha sugerido que puede deberse al incremento en la concentración de las hormonas adrenocorticales, que ocurre en animales infectados con el virus de la FPC.^{10,14,17,22}

Es probable que la diarrea ligera y los signos clínicos leves observados entre los días 7 y 11 en los animales que se recuperaron, sean un reflejo de las alteraciones en el número y probablemente en la fisiología de las células circulantes y del sistema inmune, que ocurre durante la infección. Un efecto semejante se observó con una cepa vacunal de FPC, que al aplicarse a los cerdos redujo la fagocitosis de los macrófagos alveolares e incrementó las infecciones respiratorias.^{15,16}

Los resultados obtenidos indican que los animales que son capaces de controlar la infección sufren un periodo de desbalance de la concentración de los leucocitos circulantes que probablemente resulte en inmunosupresión. Esto permitiría entender por qué en los brotes de FPC atípica, con letalidad entre 40% y 50%, se exacerbaban las infecciones secundarias de tipo digestivo y respiratorio en los cerdos que se enferman y sobreviven. Sin embargo, este desbalance es transitorio y la recuperación de los animales está aso-

ciada con el incremento de leucocitos circulantes que alcanzan valores normales.

Abstract

Classical swine fever virus (CSFV) infection depletes all circulating leukocyte subpopulations and induces immunosuppression in pigs that get infected and die. However, there are no reports on the effect of leukocyte concentrations in animals that survive the viral infection. In order to determine this effect, six pigs of 45 days of age, that developed the disease and survived during an experimental infection, were used. Parameters evaluated included: Clinical signs, rectal temperature, haematic biometry and lymphocyte subpopulations measured by rosettes with erythrocytes. Results showed that rectal temperature increased from day seven until day twelve after the infection. The latter was associated with lack of appetite, weakness and slight diarrhea. Concentration of leukocytes, lymphocytes, segmented and banded polymorphonuclear cells, monocytes, T total (TE), T high affinity (Taa), B with fc receptor (Bfc) and Null lymphocyte subpopulations was decreased during the first seven days. Concentration of autologous T (Taut) lymphocytes, which are immature cells at the same time, was increased, and there was no alteration on the concentration of B lymphocytes with the complement receptor (Bc). Moreover, concentration of most of the cells starting the seventh day on after the infection was increased, but Taut was decreased. These results indicate that the recovery of the disease was associated with an increase in almost all leukocyte and lymphocyte subpopulations.

Literatura citada

1. Aguirre, F., AgUILAR, P., MartíNEZ, A. y Morilla, A.: Aspectos epidemiológicos de la campaña de vacunación intensiva contra la Fiebre Porcina Clásica en el estado de Guanajuato. *Tér. Pec. Méx.*, 32: 39-42 (1994).
2. Bentinic-Smith, J.: Hematology. In: *Textbook of Veterinary Clinical Pathology*. Edited by: Medway, W., Prier, J.E., Wilkinson, J.S., 205-218. *The Williams and Wilkins Co.*, Baltimore, Maryland, 1969.
3. Charley, B., Corthier, G., Houdayer, M. et Rouze, P.: Modifications des réactions immunitaires au cours de la peste porcine classique. *Ann. Rech. Vet.*, 11: 27-33 (1980).
4. Corthier, G., Labadie, J.P. et Petit, E.: Réponse immunitaire humorale et cellulaire du porc consecutive à l'infection subclinique par le virus de la peste porcine classique. *Bull. Acad. vet. Fr.*, 50: 425-433 (1977).
5. González-Vega, D., Cisneros, M.I., Vega, L.M.A. y Morilla, A.: Perfil inmunológico de los cerdos durante las primeras diez semanas de edad. *Vet. Méx.*, 24: 217-221 (1993).
6. Liess, B.: Pathogenesis and epidemiology of hog cholera. *Rech. Vet.*, 18: 139-145 (1987).
7. Lunney, J.K.: Characterization of swine leukocyte differentiation antigens. *Immunol. Today*, 14: 147-149 (1993).
8. MartíNEZ, A., Cisneros, I., González-Vega, D., Arriaga, C. y Morilla, A.: Perfil inmunológico de cerdos inoculados

- con el virus de la fiebre porcina clásica. *Téc. Pec. Méx.*, 31: 128-136 (1993).
9. Medina-Iturbe, E.M.: Estudio epizootiológico de la fiebre porcina clásica en el estado de Guanajuato durante los años de 1983 a 1991. Tesis de licenciatura. *Fac. de Med. Vet. y Zoot.* Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, Estado de México, 1993.
 10. Mochesney, M.B. and Oldstone, M.B.A.: Viruses perturb lymphocyte functions: Selected principles characterizing virus induced immunosuppression. *Annu. Rev. Immunol.*, 5: 279-295 (1987).
 11. Oirschot van, J.T.: Experimental production of congenital persistent swine fever infections. II. Effect on functions of the immune system. *Vet. Microbiol.*, 4: 133-147 (1979).
 12. Oirschot van, J.T., Jong de, D. and Huffels, N.D.N.H.J.: Effect of infection with swine fever virus on immune system. I. Response of lymphocytes from blood and lymphoid organs from infected and normal pigs to anti-immuno-globulin serum and protein A. *Vet. Microbiol.*, 6: 41-57 (1981).
 13. Oirschot van, J.T., Jong de, D. and Huffels, N.D.N.H.J.: Effect of infection with swine fever virus on immune functions. II. Lymphocyte response to mitogens and enumeration of lymphocyte subpopulations. *Vet. Microbiol.*, 8: 81-95 (1983).
 14. Oldstone, M.B.A.: Viruses can cause disease in the absence of morphological evidence of cell injury: Implication for uncovering new diseases in the future. *J. Infect. Dis.*, 159: 384-389 (1989).
 15. Pijoan, C., Campos, M. and Ochoa, G.: Effect of hog cholera vaccine strain on the bactericidal activity of porcine alveolar macrophages. *Rev. Latinoam. Microbiol.*, 2: 69-72 (1980).
 16. Pijoan, C. and Ochoa, G.: Interaction between a swine fever vaccinal virus and *Pasteurella multocida* in the production of pneumonia in pigs. Proceedings of the International Pig Veterinary Society Congress. Copenhagen, Denmark. 1980. 195. *International Pig Veterinary Society*. Copenhagen, Denmark (1980).
 17. Ressang, A.A.: Studies on the pathogenesis of hog cholera. II. Virus distribution in tissues and the morphology of the immune response. *Zentralb. Veterinaermed. Reihe B*, 20: 272-288 (1973).
 18. Salmon, H.: Rosette-formation of pig thymic lymphocytes with sheep and pig erythrocytes. II. Markers for cortical and medullary thymocytes. *Thymus*, 5: 105-113 (1983).
 19. Salmon, H., Rivier, Y., Gouere, P. et Goret, P.: Technique d'identification des sous-population lymphocytaires porcines. *Bull. Acad. vet. Fr.*, 48: 119-126 (1975).
 20. Swinscow, T.D.V.: Statistics at Square One. *British Medical Association*, London, 1978.
 21. Vega, M.A., Rico, J. y Sánchez-Hidalgo, C.: Determinación de linfocitos T y B. En: Manual de Inmunología. Editado por: Morilla, A., Bautista, R., 295-299. *Diana*, México, D.F., 1986.
 22. Woodruff, J.F. and Woodruff, J.J.: The effect of viral infections on the function of the immune system. Edited by: Notkins, A.L., 393-418. *Academic Press*, New York, 1975.