



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

"CUAUTITLAN"

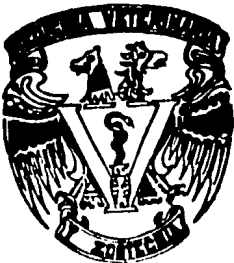
**EFFECTOS DEL VIRUS DEL COLERA PORCINO SOBRE
LOS LEUCOCITOS Y LAS SUBPOBLACIONES DE
LINFOCITOS CIRCULANTES DE LOS CERDOS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

P R E S E N T A

ARACELI CASILDA HERNANDEZ MACIAS



Director y Asesor de Tesis:

M.V.Z., MS., PhD. ANTONIO MORILLA GONZALEZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

MAYO 1986



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

C O N T E N I D O

INTRODUCCION -----	1
OBJETIVOS -----	17
MATERIAL Y METODOS -----	18
RESULTADOS -----	24
DISCUSION -----	39
CONCLUSIONES -----	43
REFERENCIAS -----	44

INTRODUCCION

El Cólera Porcino (CP) es una enfermedad altamente transmisible, que afecta en forma natural únicamente al cerdo (5, 6, 12, 26, 29). En México se considera como el problema más grave que afecta la porcicultura nacional, tanto desde el punto de vista epizootiológico como por la repercusión económica que representa para el país (18).

Su distribución geográfica es mundial, excepto en Australia, Canadá, Dinamarca, Estados Unidos, Finlandia, Gran Bretaña, Islandia, Irlanda, Japón, Nueva Zelanda donde ha sido erradicada (38, 43, 44).

Se calcula que en 1980, México perdió 757 millones de pesos a causa del CP y, en ese año, la población porcina era menor. Actualmente se considera que la población porcina sobrepasa a los 20 millones de cerdos, por lo que se estima que las pérdidas económicas anuales sean de aproximadamente 1,200 millones de pesos (3, 13), y de estos se gastan 500 millones de pesos al año únicamente en la compra de vacuna; esto sin contar los gastos de aplicación, las pérdidas que se producen por abortos, retraso en el crecimiento de los animales que-

no mueren, asesoría médica y principalmente el hecho de que no se puede exportar pie de cría o canales a otros países, en donde el CP ha sido erradicado y donde pueden comercializarse mejor (7, 12, 43, 44).

Los estados que mayor índice de focos de CP tienen a nivel nacional son: Michoacán (29 %), Guanajuato (18 %), Jalisco (10 %), Yucatán (6 %), México (5 %) (44). Es en estos estados donde mayores pérdidas económicas se producen; esto quizá sea debido, a que no hay un buen control en la introducción de animales tanto hacia las granjas como a la zona (6, 12, 35), o bien que las vacunas que se utilizan no proporcionan una sólida inmunidad debido al mal manejo del biológico o fallas en su producción (18, 20, 32, 43, 44).

Características del Virus

El CP es producido por un virus clasificado dentro del género Pestivirus, y de la familia Togaviridae (2, 12, 27). Es un virus esférico de 40-70 nanómetros-- (nm) de diámetro, con una envoltura adosada a una nucleocápside esférica de 25-35 nm de diámetro de simetría icosaédrica (18, 32). Su genoma está constituido por una sola molécula de ARN de cadena sencilla de sentido positivo, con un peso de 4.2×10^6 daltons, el cual equivale

al 5.8 % del peso del virus (2, 27). El ARN se ha clasificado de cadena positiva debido a que es capaz de infectar células y de inducir la síntesis de proteínas in vitro.

El virus es sensible al éter, cloroformo y lo afecta la luz solar; sin embargo resiste bien los procesos de salado, congelación y se conserva viable durante mucho tiempo en la médula de los huesos (12, 27, 50). El ciclo de replicación viral se inicia con la adherencia -- por medio de receptores, sigue la penetración, desnudación viral, síntesis de proteínas y ARN; hasta llegar al último paso que es la gemación o brote que en el caso de los pestivirus, ocurre con frecuencia en las vacuolas y en la membrana celular (27). El virus del CP se multiplica en diversas células entre las que se encuentran los leucocitos y las células endoteliales en el animal vivo, de ahí que cause leucopenias tan marcadas y hemorragias petequiales en el organismo (55).

El virus del CP comparte determinantes antígenicos con el de la enfermedad de la diarrea viral bovina (DVB) (49); esto ha sido aprovechado para intentar inmunizar cerdos susceptibles al CP con virus vacunales de -

DVB; por ejemplo, la cepa DVB, Oregón C₂₄B, produce una buena protección contra algunas cepas de CP, pero no contra todas. Se ha inculcado vacuna para la DVB, por diferentes vías, a los cerdos y posteriormente se han desafiado con cepas patógenas de CP encontrándose que hay protección, pero menor del 100 % (12, 50).

Características de la enfermedad

La presentación clínica de la enfermedad es variable y diversos autores la suelen clasificar de acuerdo con los días de duración de la enfermedad (5, 18, 38):

1. Hiperaguda ----- 4 - 8 días los animales mueren.
2. Aguda ----- 9-18 días los animales mueren.
3. Subaguda ----- 20-29 días los cerdos mueren.
4. Crónica ----- 30-90 días los cerdos mueren o bien logran recuperarse.

Otros autores clasifican al CP en dos: (19, 39, 43).

1. Cólera Típico o Clásico.
2. Cólera Atípico : a) Tremor congénito de los lechones.
b) Cólera agudo en recién nacidos.
c) Cólera agudo por contacto con animales vacunados.
d) Cólera post-vacunal de baja patogenicidad.

El CP puede suceder con mayor frecuencia en piaras en donde los animales no han tenido contacto con la enfermedad en las que se alcanza casi un 100 % de morbilidad y mortalidad; en estos casos la enfermedad puede diagnosticarse con facilidad ya que existe una mínima onula contaminación bacteriana. Sin embargo, en animales que ya han tenido contacto previo con la enfermedad y esten parcialmente inmunes el diagnóstico es más complicado, pues los signos clínicos son variados. Además, es posible que las hembras gestantes transmitan la infección a los lechones por vía transplacentaria (Liess 1981), y que se provoquen efectos teratógenicos, muertes, malformaciones, momificaciones, neonatos o muertes perinatales o bien, que nazcan los animales y que presenten una infección subclínica persistente de la enfermedad, y que sean al mismo tiempo portadores del virus y de esta manera se siga diseminando la enfermedad tanto en la granja como en la zona (6, 7, 19, 20, 30, 34, 42).

Los signos clínicos más importantes de la enfermedad son: pérdida del apetito, aumento de la temperatura (41-42°C), temblores musculares, amontonamiento en los rincones, estreñimiento alternado con periodos de diarrea de color mostaza, secreciones mucopurulentas de

de ojos (legañas), descargas nasales, eritemas en la piel del vientre, orejas, parte interna de los muslos, vómito, disnea.

La cuenta leucocitaria total disminuye de 9 000 a 3 000 o menos células/mm³ (1, 25); la cuenta más baja se ha encontrado entre el cuarto y séptimo día después de la infección (6, 7). Los signos nerviosos suelen ser ataxia, parálisis, temblores, incoordinación y convulsiones (9, 12, 18, 20).

Las lesiones a la necropsia que con mayor frecuencia se encuentran son: hemorragias petequiales en la mucosa de la vejiga, en tejido subcutáneo, laringe, mucosa gástrica, ganglios linfáticos (mandibulares, escapulares, inguinales, hepáticos, renales), infartos en bazo y riñón, tonsilas con hemorragias, abscesos y congestión. Úlceras botonosas en válvula ileocecal que se observan en la fase subaguda y crónica de la enfermedad también en éstas etapas se puede observar el engrosamiento de la línea de osificación costo-condral (26, 29, 32, 34, 38, 39, 42, 43).

Control por vacunacion

Para poder controlar el CP es necesario el uso de vacunas; estas deben proporcionar un buen grado de seguridad y protección, de otra manera se corre el riesgo de que se exacerben los problemas infecciosos, los crónicos o que se pueda presentar la enfermedad en forma aguda (9). Se han hecho trabajos para decidir cual es la vacuna ideal para conocer la dosis con la cual los animales quedan protegidos, para determinar que efectos secundarios puede tener el uso indiscriminado de vacunas, y conocer como se afectan los animales después de la aplicación, por ejemplo cólera atípico post-vacunal (13, 34, 36, 53, 54).

Existen varios tipos de vacunas contra el CP- pero las que más se utilizan son: vacunas a base de virus vivo modificado, vacunas a base de virus inactivado y sueros hiperinmunes.

Las principales características de las vacunas de virus vivo modificado son: a) estar elaboradas con virus de cólera porcino activo modificado; b) producirse en cultivos celulares primarios o estables de cerdo, bovino, sangre, bazo y/o ganglios linfáticos de conejo;

c) se les debe hacer prueba de pureza, con la cual se determina que el producto vacunal esta libre de cualquier contaminante; d) tener un título de 1×10^3 partículas por dosis como mínimo; e) se les debe hacer una prueba de inocuidad, en donde el elaborador asegura el grado de protección (36).

Las características de la vacuna de virus inactivado son: a) que los virus que se utilizan estén inactivados; b) su origen puede ser de sangre y/o bazo de cerdo infectado; c) se debe producir en cerdo o conejos sanos; d) se les debe realizar pruebas de pureza e inocuidad; e) se les debe hacer prueba de potencia.

El suero hiperinmune tiene las siguientes características: a) proviene de suero sanguíneo o plasma que contenga anticuerpos específicos obtenidos de cerdos hiperinmunes con virus de cólera porcino; b) puede contener preservativos; c) para poder producirlo se necesita de cerdos sanos; d) se le debe hacer prueba de pureza; e) practicársele prueba de seguridad e inocuidad (36).

Una de las vacunas inactivadas más utilizada,

fué la de cristal violeta, la cual fué desarrollada por McBryde y Cole (1963), la vacuna se prepara a partir de sangre virulenta de cerdo desfibrinada a la que se le agrega glicerina y cristal violeta; cuando se aplica a los cerdos la vacuna, desarrolla buena inmunidad.

Las vacunas que se utilizan de virus vivo son preparadas a partir de virus modificado, ya sea por pases en series de conejo, o pases alternados en conejos y cerdos, o a través de cultivos celulares.

Los virus atenuados proporcionan una inmunidad precoz, más sólida y más duradera que las vacunas de virus inactivados (33, 36, 48). Las vacunas contra el cólera porcino de mayor uso en México son elaboradas con virus vivo modificado (33).

Las vacunas que mayor importancia tienen son las atenuadas PAV-1, PAV-250; con la GP se erradico en Japón, y la de la cepa China; los resultados obtenidos hasta ahora son que ha funcionado mejor la cepa China, además de que es la más utilizada (42, 48, 52).

Respuesta inmune

El desarrollo de la respuesta inmune de cerdos inoculados con CP ha sido estudiada por medio de pruebas de seroneutralización, hemoaglutinación, transformación blastoide de linfocitos. También se han tomado en consideración las cuentas leucocitarias, se ha observado que la vacuna elaborada con cepa China provoca una leucopenia muy marcada hacia los días tercero y séptimo después de la vacunación con esto se pone de manifiesto que el periodo de viremia dura de 10 a 11 días (52, 55).

El calostro de las cerdas inmunizadas contra el CP confiere protección a los lechones durante 5-7 semanas después del parto; con referencia a esto se han hecho trabajos para conocer que tanto protege el calostro a los lechones y se ha podido demostrar que confiere una protección sólida por lo menos durante las primeras semanas de vida (11, 14, 15, 31, 32, 35, 40).

La respuesta inmune de los cerdos depende mucho de la edad, o sí de los cerdos provenientes de madres inmunizadas y tienen anticuerpos calostrales. El lechón es defendido en forma pasiva a través del calostro, a -

los diez días los lechones tienen una débil respuesta inmune, por lo que se considera que es hasta después del destete o bien a las seis semanas en que los lechones pueden defenderse por sí solos, por lo que hay que tener en cuenta que no se pueden vacunar antes, ya que los anticuerpos maternos pueden neutralizar a las vacunas (10, 11, 14, 16, 35, 37).

El virus del CP es inmunosupresor dado que se observa una disminución en la respuesta humoral a un antígeno no relacionado con la enfermedad como sería la lisozima, así como un bajo índice de estimulación en la transformación blastoide, esto tanto en animales vacunados como en animales no vacunados, pero esta reacción dura hasta 11 días después de la infección, ya que después de este periodo los animales que han creado anticuerpos contra la enfermedad se recuperan y logran tener nuevamente la capacidad de responder en la transformación blastoide (9'). En diversos trabajos se ha estudiado la respuesta inmunológica (9', 14, 15, 16), y se puede deducir que el cólera porcino produce una inmunosupresión ya que provoca una marcada leucopenia en los cerdos no vacunados y ésta se muestra a los 14 días después de la infección, mientras que en los cerdos que -

han sido vacunados la leucopenia es transitoria y menos intensa, además de que se presenta un retardo en la síntesis de anticuerpos de la respuesta secundaria contra un antígeno no relacionado con el virus (9').

En la enfermedad de Peste Porcina Africana - (PPA), se han encontrado efectos similares, como el que se presenta una leucopenia, así como una trombocitopenia al igual que en CP, pero también se ha encontrado - que la replicación del virus puede hacerse en monocitos y macrófagos provenientes de médula ósea, y en leucocitos. Con estos estudios se ha comprobado que los monocitos son más sensibles al virus que los leucocitos. Otro dato importante de estos estudios es que al igual que - en el cólera porcino el número de los linfocitos circulantes decrece, mientras que el número de neutrófilos - se incrementa debido al reemplazo que ocurre de las formas maduras por formas juveniles (52').

No se han hecho estudios más profundos sobre el efecto del virus del cólera porcino sobre el sistema inmune del cerdo. Con respecto al sistema inmune normal se puede mencionar lo siguiente: los linfocitos B son - precursores de células plásmáticas y son productores de

anticuerpos, tienen en su membrana receptores específicos para la porción Fc de la inmunoglobulinas. La aparición de receptor de complemento (C') en la membrana de los linfocitos es indicativo de madurez de la célula. Existen dos subpoblaciones de linfocitos B; los B con receptor para Fc que forman rosetas con eritrocitos cubiertos de anticuerpos (Bfc). Los linfocitos con receptor para complemento, los cuales forman rosetas con eritrocitos cubiertos de complemento, y poseen receptor para el factor C_{3b} del complemento (BC').

Los linfocitos T son capaces de unir glóbulos rojos de borrego y formar rosetas, estos linfocitos no sintetizan anticuerpos y suelen aparecer durante la maduración. Existen tres subpoblaciones de linfocitos T; los T totales que forman rosetas con eritrocitos de borrego (Ttot); los T autólogos que forman rosetas con eritrocitos de cerdo (Taut), son marcadores de inmadurez, y los T de alta afinidad que forman rosetas con eritrocitos de borrego en 30 minutos (Taa), son marcadores de madurez (10).

Los linfocitos Null, estos no poseen ningún marcador para formar rosetas ni con eritrocitos de cerdo

ni de borrego, al nacer los animales estas células tienen un número muy alto, pero al paso del tiempo estos valores disminuyen. En algunos trabajos de postula que estas células pueden ser inmaduras y conforme pase el tiempo estas se transforman en linfocitos T, ya que después de una timectomia los valores decrecen (4, 10, 21, 37, 41, 45, 47, 48).

Los valores normales de las células en los cerdos son (10, 32, 38).

Eritrocitos	-----	6.5×10^6 células/mm ³ .
Leucocitos	-----	$11-22 \times 10^3$ células /mm ³ .
Eosinófilos	-----	55-2420 células/mm ³ .
Basófilos	-----	0-440 células/mm ³ .
Monocitos	-----	220-2220 células/mm ³ .
Linfocitos	-----	3290-13640 células/mm ³ .
N. Segmentados	-----	3080-10340 células/mm ³ .
N. en Banda	-----	0-880 células/mm ³ .

Los valores encontrados en la décima semana de edad son (10).

Leucocitos	-----	15,782-13,736	células/mm ³ .
Linfocitos	-----	9,453- 8,228	células/mm ³ .
Monocitos	-----	1,263- 1,099	células/mm ³ .
N. Segmentados	-----	4,103- 3,571	células/mm ³ .
N. en Banda	-----	317 - 275	células/mm ³ .
Eosinófilos	-----	317 - 275	células/mm ³ .

Por medio de la formación de rosetas se puede conocer las subpoblaciones de los linfocitos, estos valores son de animales de diez semanas de edad (10).

Rosetas T.

Linfocitos T totales	-----	47.3%
Linfocitos T aa.	-----	29.8%
Linfocitos T aut.	-----	0.8%

Rosetas B.

Linfocitos B fc	-----	27.8%
Linfocitos B C'	-----	27.4%
Linfocitos Null	-----	24.9%

Durante la primera semana de vida los linfocitos Null incrementan notablemente sus porcentajes y dis

minuyen hacia la décima semana (34-24 %); sin embargo - en los valores absolutos hay un pequeño aumento (10).

La cuenta leucocitaria es la prueba que más - se utiliza para el diagnóstico de laboratorio, ya que - el virus provoca una disminución de los leucocitos; to- mando en cuenta ésto, y el trabajo realizado por Cisne- ros en 1985, se realizó este trabajo para comparar los- valores que se obtuvieron después de inocular cerdos - susceptibles, además de comprobar si es que el virus - provoca una disminución de los linfocitos, así como de- las subpoblaciones de estos, y observar las alteracio- nes que se provocan en la biometría hemática.

OBJETIVOS

- 1.- Determinar como se afectan las concentraciones de - leucocitos, linfocitos, monocitos, neutrófilos en - banda, neutrófilos segmentados, eosinófilos y basófilos en cerdos inoculados experimentalmente con - virus de cólera porcino.
- 2.- Conocer como se afectan las subpoblaciones de los - linfocitos circulantes, en lechones inoculados expe rimentalmente con virus de cólera porcino.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

ANIMALES: Se utilizaron 10 cerdos susceptibles al cólera porcino, de aproximadamente 60 días de edad - que no habían sido vacunados previamente contra el cólera porcino.

VIRUS DE EXPOSICIÓN: Se utilizó virus patógeno de cólera porcino, cepa AMES con un título de 1×10^6 partículas virales que es la DL_{50} por mililitro. A cada animal se les inocularon 2ml por vía intramuscular(IM).

PROCEDIMIENTO: Antes y cada tercer día después de la inoculación, a cada animal se le tomó una muestra de sangre para determinar leucocitos totales, neutrófilos segmentados, neutrófilos en banda, eosinófilos, basófilos, monocitos, linfocitos T totales (Ttot), linfocitos T de alta afinidad (Taa), linfocitos T autólogos (Taut), linfocitos B con receptor para fo (Bfc), - linfocitos B con receptor para complemento (BC'), así - como linfocitos Null.

También se obtuvo sangre heparinizada, para hacer - cuentas leucocitarias; se mezcló la sangre con reactivo de Turk, y se contaron los leucocitos en la cámara de - Neubauer para obtener los valores absolutos. De esta misma sangre se hicieron frotis sanguíneos para teñirlos -

con colorante de Wright modificado y se contarón linfocitos, monocitos, neutrófilos segmentados, neutrófilos en banda, eosinófilos y basófilos.

TECNICA PARA LA PURIFICACION DE LINFOCITOS.

1. La sangre se obtiene por punción yugular (10 ml).
2. Se desfibrina con perlas de vidrio.
3. Se lava la sangre 3 veces con solución salina balanceada de Hank, por medio de centrifugación durante 10 minutos a 800 xg, decantando el sobrenadante cada vez.
4. En el último lavado se obtiene la capa blanca de linfocitos, se depositan suavemente en un gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque (24 partes al 9% en solución acuosa de Ficoll y 14 partes al 34% de Hypaque, laboratorios Sigma-Winthrop), con una densidad específica de 1.076 gr/cm^3 . Centrifugar a 800 xg durante 30 minutos.
5. Se colecta la fracción media, la cual es rica en linfocitos y se lavan dos veces en solución salina balanceada de Hank, por medio de centrifugación durante 10 minutos a 800 xg decantando el sobrenadante en cada lavado.
6. El botón de linfocitos se resuspende en 1 ml de solu

ción salina balanceada de Hank, suplementada con 2% de Suero Fetal Bovino; se ajusta la cantidad necesaria para tener de 4 a 5×10^6 células por mililitro.

La viabilidad celular se determina con colorante de Azul de Tripano en solución al 2%.

OBTENCION DE GLOBULOS ROJOS DE BORREGO (GRB) Y DE CERDO (GRC).

La sangre de ambas especies se obtiene en solución de Alsever (volumen-volumen), y se lavan de 2 a 3 veces cada una de ellas con solución salina amortiguadora de fosfatos (SSAF), pH 7.4 por centrifugación a 300 xg durante 10 minutos, se decanta el sobrenadante. Los eritrocitos deben de quedar exentos de hemoglobina-libre y de la capa flogística.

Del botón de eritrocitos de borrego se toman 0.2ml y se mezclan con 9.8 ml de SSAF; ésta es la Solución al 2% de GRB.

Del botón de eritrocitos de cerdo se toman 0.2 ml y se mezclan con 9.8 ml de SSAF; ésta es la Solución al 2% de GRC.

Del botón de eritrocitos de borrego se toman 0.2ml y se mezclan con 9.8 ml de SSAF; ésta es la Solución al 5% de GRB.

Los GRB se usarón para formar rosetas totales y de alta afinidad (Ttot. y Taa.), y los GRC para formar rosetas autólogas (Taut); todas estas subpoblaciones son de linfocitos T.

SENSIBILIZACION DE GRB CON HEMOLISINA Y COMPLEMENTO.

De la suspensión de GRB al 5% se toman 5 ml, se mezclan con 4.975 ml de solución salina fisiológica y 25 microlitros de hemolisina que contenga una unidad-subaglutinante, se incuba durante 30 minutos a 37°C y - después se incuba 30 minutos a 4°C. Los GRB se lavados veces con solución salina balanceada de Hank durante 10 minutos se centrifuga a 800 xg decantando el sobrenadante después de cada lavado. El botón se resuspende en 5 ml de solución salina balanceada de Hank. Esta suspensión se usó para formar rosetas de linfocitos B - con receptor para fc (Bfc).

De los GRB sensibilizados para formar Bfc se toman 2.5 ml y se mezclan con 2.459 ml de solución salina fisiológica y 41 microlitros de suero de conejo (como fuente de complemento); se incuba 20 minutos a 37°C. Los GRB con complemento se lavan dos veces con solución salina balanceada de Hank por medio de centrifugación a

800 xg durante 10 minutos, decantando el sobrenadante - después de cada lavado; el botón se resuspende en 5 ml de solución salina balanceada de Hank; esta suspensión se utilizó para formar rosetas de linfocitos B con receptor para complemento (BC').

FORMACION DE ROSETAS.

Formación de rosetas de linfocitos T

Rosetas T totales.- Se mezclan 0.2 ml de GRB al 2% con 0.2 ml de suspensión de linfocitos con una concentración de 4 a 5×10^6 células por mililitro; se incuban a 4°C durante 18 horas y se centrifuga de 3 a 5 minutos a 400 xg.

Rosetas T de alta afinidad.- Se mezclan 0.2 ml de GRB - al 2% con 0.2 ml de suspensión de linfocitos con una concentración de 4 a 5×10^6 células por mililitro; se incuban 15 minutos a 37°C y se centrifuga de 3 a 5 minutos a 400 xg.

Rosetas T autólogas.- Se mezclan 0.2 ml de GRB al 2% - con 0.2 ml de suspensión de linfocitos con una concentración de 4 a 5×10^6 células por mililitro; se incuban a 4°C durante 18 horas y se centrifuga de 3 a 5 minutos a 400 xg.

Formación de rosetas de linfocitos B.

Rosetas Bfc (fracción fc de las inmunoglobulinas).- Se mezclan 0.2 ml de GRB sensibilizados con hemolisina con 0.2 ml de suspensión de linfocitos con una concentración de 4 a 5×10^6 células por mililitro; se incuban 30 minutos a 37°C y se centrifuga de 3 a 5 minutos a 400 xg.

Rosetas BC' (complemento).- Se mezclan 0.2 ml de GRB sensibilizados con complemento con 0.2 ml de suspensión de linfocitos con una concentración de 4 a 5×10^6 células por mililitro; se incuban 15 minutos a temperatura ambiente y se centrifuga de 3 a 5 minutos a 400 xg.

La lectura de estas mezclas se realiza utilizando volúmenes iguales de azul de tripano al 2%, con las suspensiones de rosetas.

Las rosetas se darán como positivas cuando se unan a un eritrocito, 3 ó más linfocitos. Se cuentan hasta 100 células, tomando en cuenta los linfocitos formadores de rosetas y los no formadores, los resultados son expresados en porcentajes.

RESULTADOS

De los 10 cerdos expuestos, 7 murieron y 3 sobrevivieron probablemente debido a un remanente de inmunidad materna ya que provenían de granjas donde se inmuniza contra el cólera porcino a las cerdas antes de la monta.

En relación a los valores leucocitarios, de los animales inoculados de 21,778 células por mililitro, disminuyeron a partir del segundo día post-inoculación, alcanzando hasta 4,483 células por mililitro para el día 12.

En los animales que sobrevivieron los leucocitos, alcanzan 5,000 células por mililitro hacia el día 14 (figura 1).

Las concentraciones de linfocitos, monocitos, neutrófilos en banda y neutrófilos segmentados, así como los eosinófilos, fueron disminuyendo, alcanzando los valores mínimos al día 12; en los animales que lograron sobrevivir los valores se recuperaron; sin llegar a alcanzar los valores normales (figuras 2, 3, 4).

En cuanto a los linfocitos T totales y T de alta afinidad, en las figuras 5 y 6 se pueden observar que los valores empiezan a declinar teniendo una considerable baja para el día 5, y siguen disminuyendo hasta

llegar al día 14; los valores de los linfocitos T autólogos se incrementan el día 2 después de la inoculación y se mantienen elevados, hasta el día 7 en que disminuyeron (figura 6).

En relación a los valores de linfocitos Efc, BC' y Null estos inician el descenso para el día 2, alcanzando la máxima disminución para el día 12 (figuras 7, 8).

En lo que se refiere a los porcentajes de linfocitos y sus subpoblaciones, se nota que los indicadores de inmadurez aumentan conforme transcurre la enfermedad y los que son maduros disminuyen drásticamente, principalmente hacia el día 7 después de la inoculación; para el día 12 y 14 disminuyen totalmente las subpoblaciones indicadoras de inmadurez, mientras que las indicadoras de madurez empiezan a recuperarse (figuras 9, 10, 11).

Fig. 1 CONCENTRACION DE LEUCOCITOS
CIRCULANTES EN CERDOS INOCULADOS
CON VIRUS DE COLERA PORCINO.

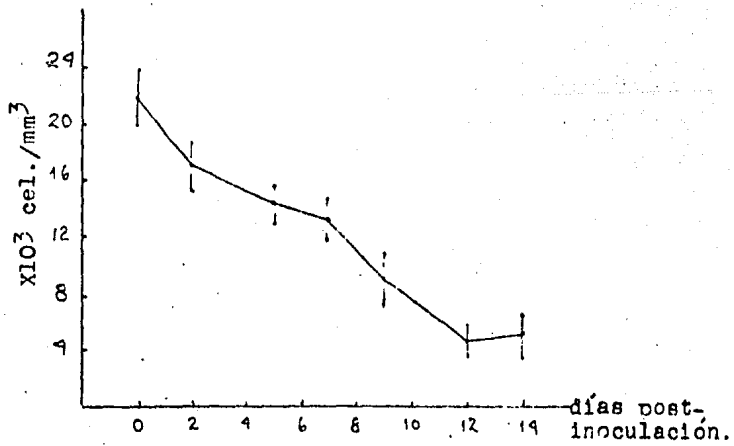


Fig. 2 CONCENTRACION DE LINFOCITOS Y MONOCITOS CIRCULANTES EN CERDOS INOCULADOS CON VIRUS DE C. P.

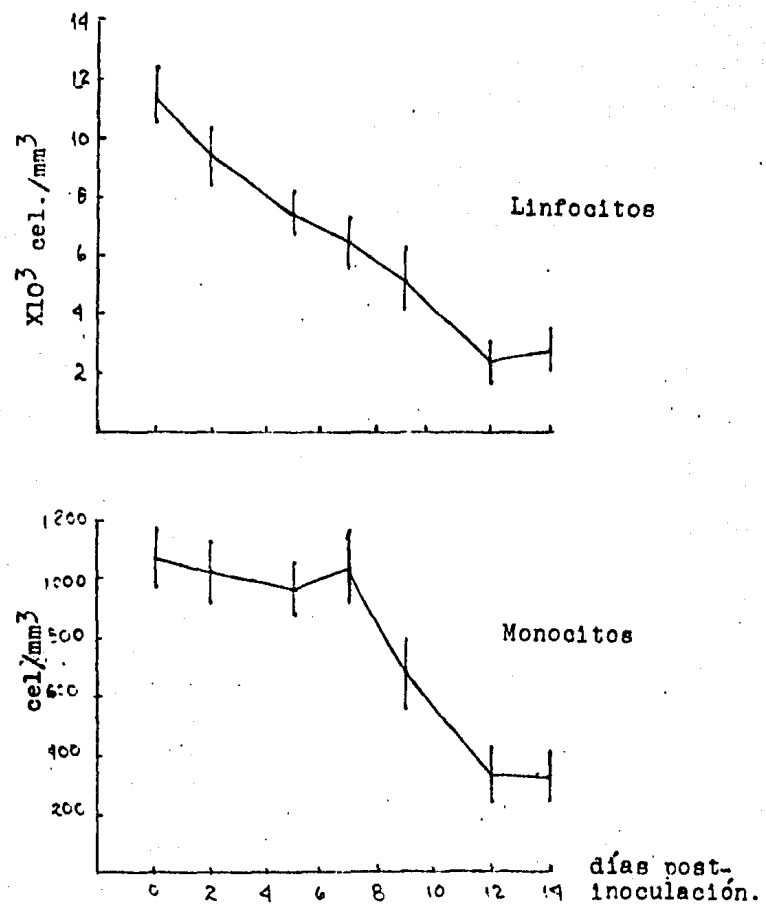
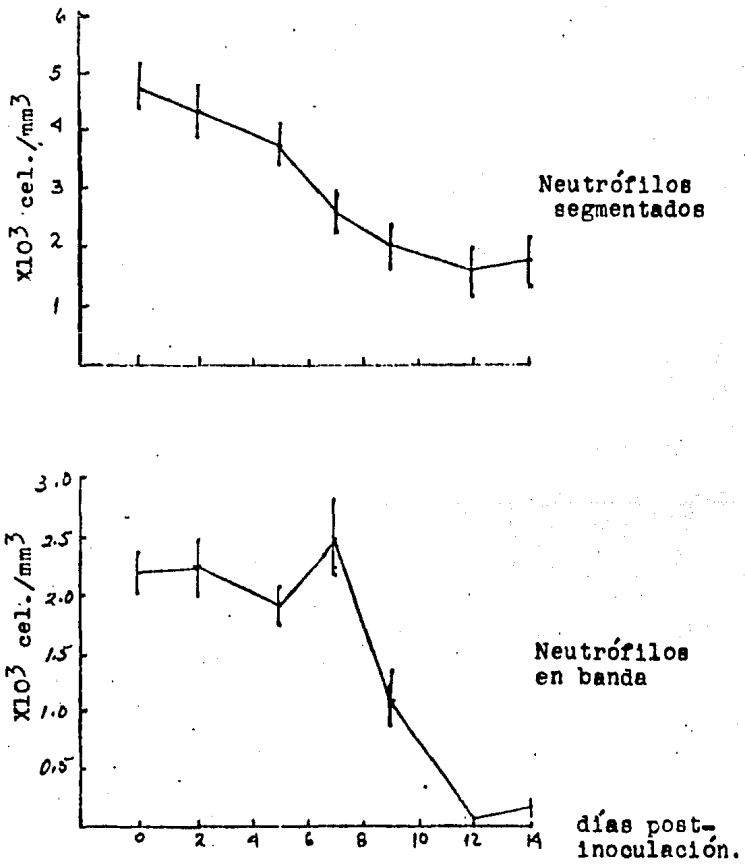


Fig. 3 CONCENTRACION DE NEUTROFILOS SEGMENTADOS Y EN BANDA, CIRCULANTES EN CERDOS INOCULADOS CON VIRUS DE COLERA PORCINO.



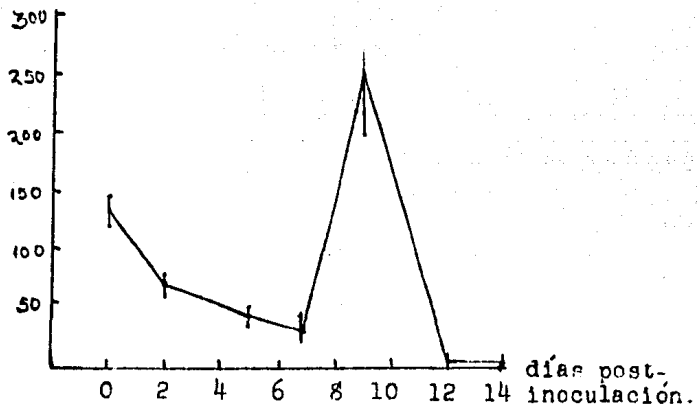


Fig. 4 CONCENTRACION DE EOSINOFILOS CIRCULANTES
EN CERDOS INOCULADOS CON VIRUS DE
COLERA PORCINO.

Fig. 5 CONCENTRACION DE LINFOCITOS T totales
CIRCULANTES EN CERDOS INOCULADOS CON
VIRUS DE COLERA PORCINO.

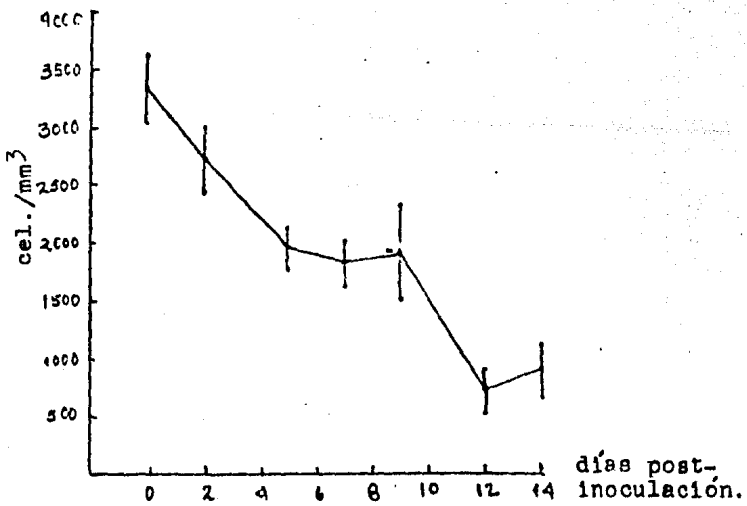


Fig. 6 CONCENTRACION DE LINFOCITOS T alta afinidad
Y T autólogos CIRCULANTES EN CERDOS INOCULADOS
CON VIRUS DE COLERA PORCINO.

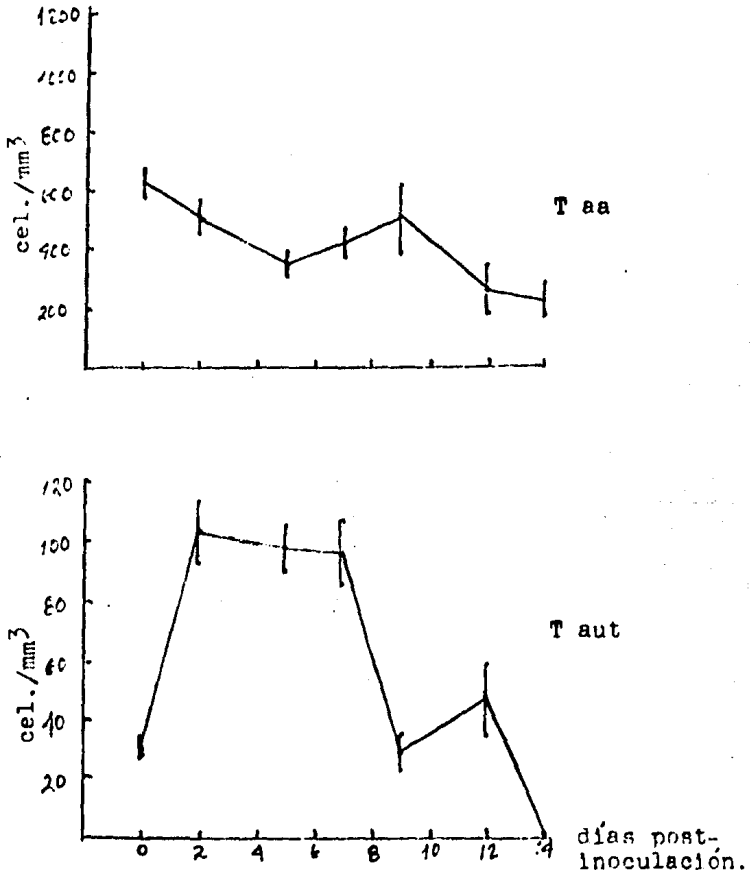


Fig. 7. CONCENTRACION DE LINFOCITOS Bfc Y BC'
CIRCULANTES EN CERDOS INOCULADOS CON
VIRUS DE COLERA PORCINO.

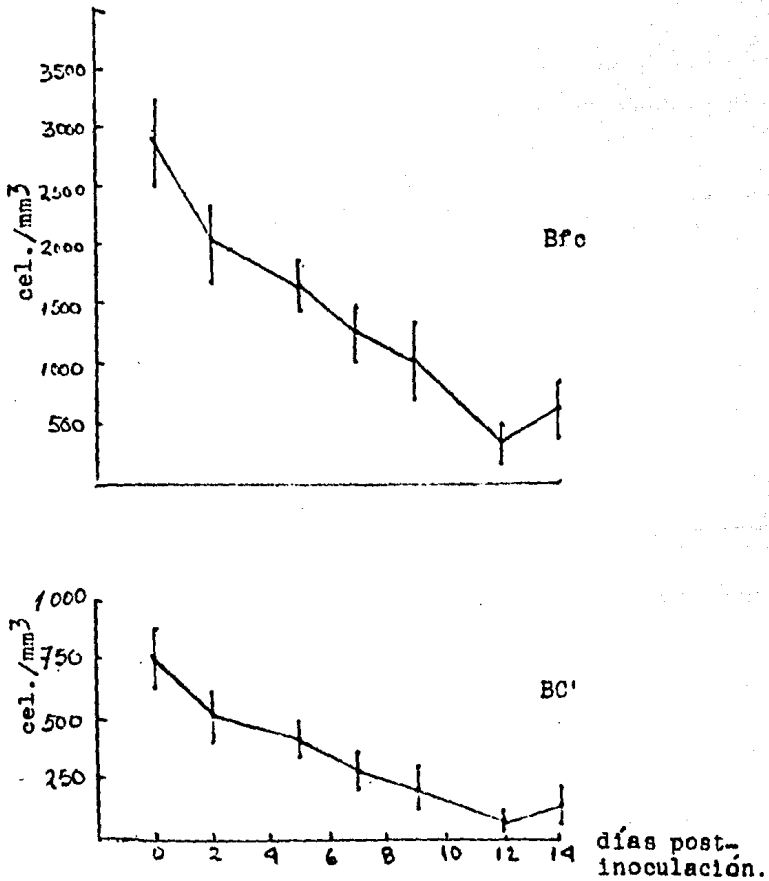


Fig. 8 CONCENTRACION DE LINFOCITOS NULL CIRCULANTES EN CERDOS INOCULADOS CON VIRUS DE COLERA PORCINO.

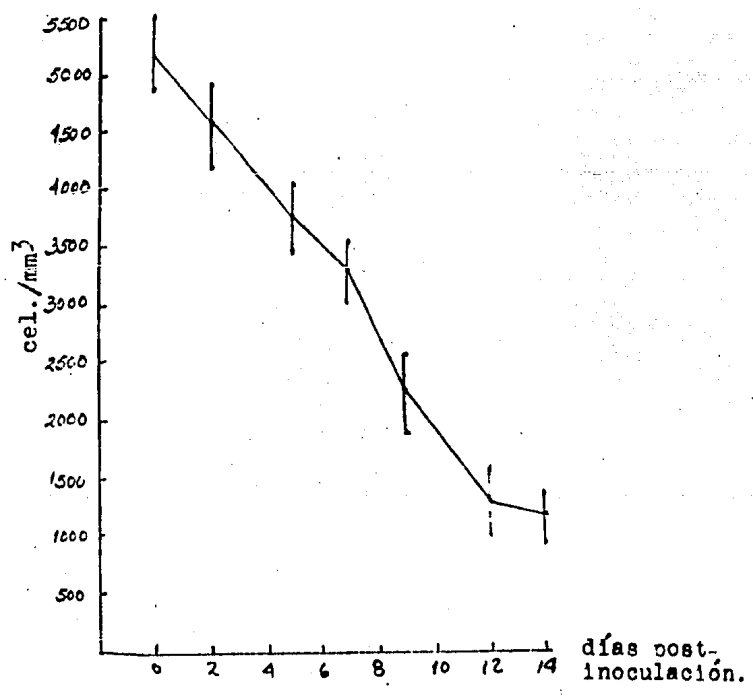


Fig. 9 PORCENTAJE DE LINFOCITOS, LINFOCITOS T totales y T alta afinidad CIRCULANTES EN CERDOS INOCULADOS CON VIRUS DE COLERA PORCINO.

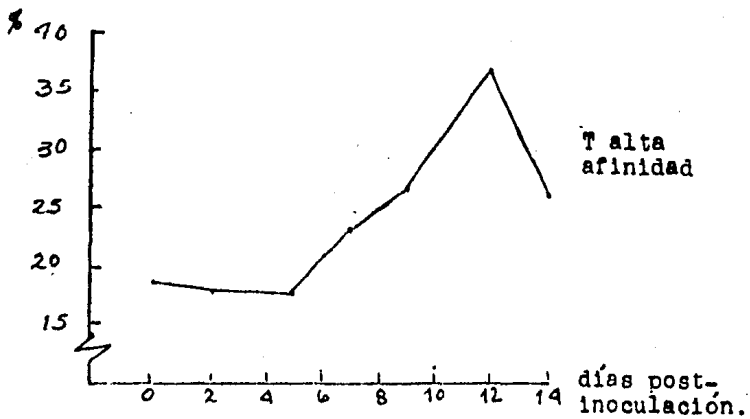
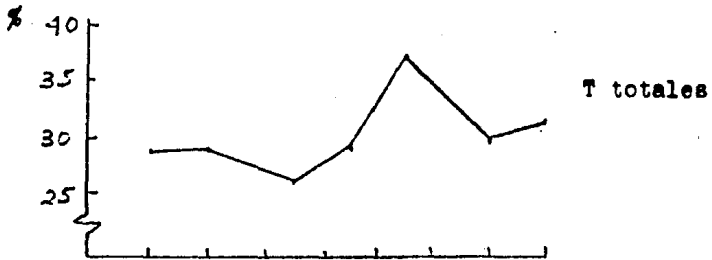
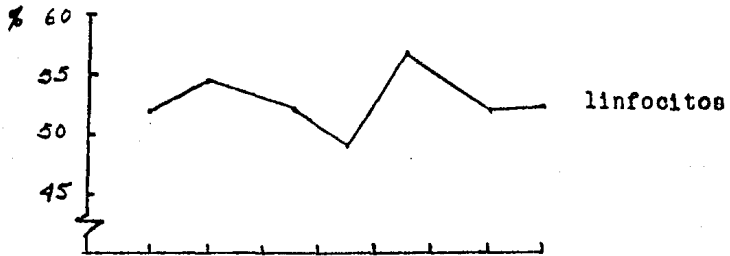


Fig. 10 PORCENTAJE DE LINFOCITOS T autólogos;
Bfc y BC' CIRCULANTES EN CERDOS INOCU-
LADOS CON VIRUS DE COLERA PORCINO.

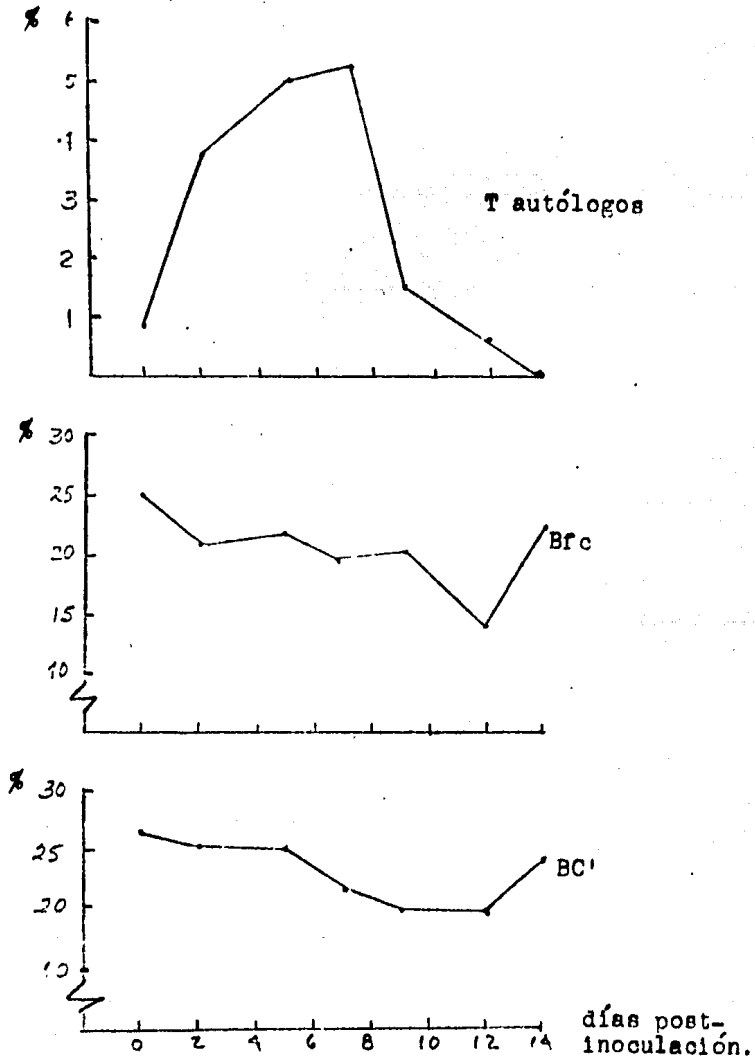
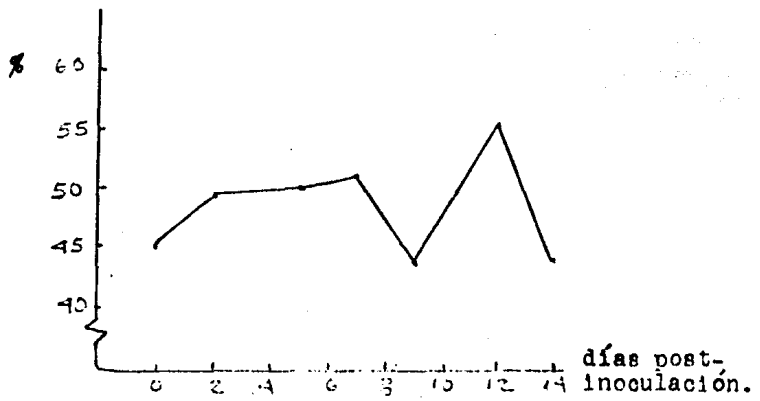


Fig. 11 PORCENTAJE DE LINFOCITOS NULL
CIRCULANTES EN CERDOS INOCULADOS
CON VIRUS DE COLERA PORCINO.



FESIS CON FALLAS DE ORIGEN

37

Cuadro 1.

Valores de células sanguíneas de animales inoculados con virus de Cólera Porcino.								
	Día 0 ¹	Día 2 ¹	Día 5 ¹	Día 7 ¹	Día 9 ⁸	Día 12 ⁸	Día 14 ⁸	
	€ No.	€ No.	€ No.	€ No.	€ No.	€ No.	€ No.	€ No.
Leucocitos	21 773	16 990	14 115	13 260	8 921	4 483	5 220	
Linfocitos	51.9 1132	54.7 9294	52.3 7382	48.2 6391	56.8 5067	52.3 2345	53.3 2605	
Monocitos	4.0 1067	6.0 1010	6.8 960	7.8 1034	7.4 660	7.3 327	6.3 315	
Neutrófilos Segmentados	21.8 4747	25.4 4315	26.9 3797	19.6 2599	22.8 2034	34.6 1551	35.6 1740	
Neutrófilos en Banda	10.2 2221	13.3 2243	17.6 1920	18.9 2506	12.5 1115	5.0 22	3.6 180	
Eosinófilos	0.6 131	0.4 68	0.7 43	0.2 27	0.28 25	1 4	1 5	

1 10 animales vivos.

8 3 animales vivos.

Cuadro 2

Valores de linfocitos de animales inoculados con virus de Cólera Forcino.

	Día 0'		Día 2'		Día 5'		Día 7'		Día 08		Día 12 ⁸		Día 14 ⁸		
Leucocitos	21	778	16	990	14	115	13	260	8	921	4	483	5	000	
	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	
Linfocitos	51.9	1132	54.7	9204	52.3	7382	48.2	6301	56.8	5067	52.3	2345	53.3	2665	
Linfocitos T totales	29.4	3323	22.3	2723	26.6	1064	28.7	1234	37.4	1805	30.0	704	33.3	287	
Linfocitos T alta afinidad	13.8	625	18.6	506	17.8	350	23.0	422	26.5	502	36.6	258	26.3	233	
Linfocitos T autólogos	0.9	30	3.8	103	5.0	98	5.3	97	1.5	28	0.66	46	0	0	
Linfocitos B fc	25.3	2859	21.7	2017	22.7	1676	19.6	1253	20.0	1013	14.3	335	22.6	602	
Linfocitos BC'	26.8	766	25.8	520	25.2	422	22.0	276	20.5	208	20.0	67	24.0	144	
Linfocitos Null	45.3	5120	49.0	4554	50.7	3743	51.7	3304	44.0	2229	55.6	1304	44.0	1173	
	1	10 animales vivos.													
	8	3 animales vivos.													

DISCUSION

El virus del cólera porcino provoca una marcada leucopenia que se ha asociado a una inmunosupresión en los animales. De hecho la leucopenia se determina con fines de diagnóstico (18).

Los datos encontrados, indican que además de provocar una disminución de los leucocitos, las demás células también disminuyen y es por esto que los animales no pueden montar una respuesta inmune adecuada (55).

En este trabajo se pudo determinar la leucopenia, así como las disminuciones de las subpoblaciones de linfocitos tanto los T como los B.

De acuerdo con los resultados, el virus del cólera porcino afecta a todas las células circulantes sin tener preferencia por ninguna de ellas (1, 25).

Los neutrófilos en banda se encuentran aumentados desde el principio de la enfermedad, aunque para el día 7 se elevan considerablemente y disminuyen drásticamente después del día 9 post-inoculación (figura 5) esto se puede explicar ya que al ocurrir inmunosupresión, aparecen infecciones secundarias por gérmenes oportunistas, y que los neutrófilos en cierto momento pudieron controlar dichas infecciones; pero que aunado-

a esto existió una excesiva proliferación viral por lo que las células disminuyeron.

En cuanto a los linfocitos, monocitos y neutrófilos segmentados, da la impresión de que el virus afecta principalmente a los linfocitos destruyéndoles, y cuando ha pasado el periodo de proliferación viral las células linfoides empiezan a recuperarse (figuras 2, 3).

Los linfocitos T son los encargados de la respuesta celular y tienen 3 subpoblaciones: T totales, T de alta afinidad y T autólogas; las T de alta afinidad son marcadoras de madurez y las T autólogas son marcadoras de inmadurez (10). Como el virus del cólera por sí mismo no produce una disminución de los linfocitos, T totales y T de alta afinidad aparentemente hay un estímulo para que se produzcan linfocitos inmaduros; o T autólogos, ya que estos aumentaron considerablemente, y disminuyeron hacia el día 9 (figuras 5, 6, 9, 10)

Por otro lado los linfocitos B son los encargados de la respuesta inmune humoral y tienen dos subpoblaciones: Bfc (fracción fc de las inmunoglobulinas), y los BC' (fijadores de complemento); ambas subpoblaciones son marcadoras de madurez (10). Las subpoblaciones de los linfocitos B, se vieron drásticamente disminuidas -

desde el día 5 después de la inoculación, llegando a - sus valores más bajos hacia el día 12 (figuras 7, 10).

La concentración de linfocitos T y B debe ser de 42 % y 27 % respectivamente para establecer una respuesta inmunológica satisfactoria.

Debido a que los valores de los linfocitos T estuvieron por debajo de lo normal y los valores de los linfocitos B por encima de lo normal, es probable que - no hubo una buena complementación en cuanto a las funciones de ambos (10).

Por lo que corresponde a los valores de los - linfocitos Null estos están disminuidos desde el día de la inoculación; estos linfocitos van desapareciendo con la edad (41). En el trabajo se vio que para el día 14 - estos ya están muy debajo de lo normal en los animales que llegaron a término del experimento (figuras 8, 11).

Los resultados indican que el virus de cólera porcino destruye todos los leucocitos de la sangre aparentemente maduros, por lo que el animal produce células inmaduras (T autólogos y neutrófilos en banda), para reponer las células perdidas. Es probable que al no existir un número adecuado de células la respuesta inmune se vea deprimida.

Esto permitiría entender porque los cerdos -

con cólera porcino crónico o semi agudo presentan signos clínicos variados ya que los animales al estar inmunosuprimidos pueden ser invadidos por germen oportunistas.

CONCLUSIONES

El virus del cólera porcino produce una disminución de leucocitos circulantes (leucopenia), así como de linfocitos (linfocitopenia), y sus subpoblaciones.

En este trabajo se pudo comprobar que los linfocitos - mayormente afectados son los maduros (T totales, T de - alta afinidad, Bfc y BC'), es por esto que el sistema - inmune no puede establecer una respuesta inmunológica - satisfactoria.

R E F E R E N C I A S

- 1.- Aceves Gutiérrez F., 1971., Determinación de leucopenias producidas por vacunas de virus vivo modificado en cultivos de embrión de cerdo lapinizado., Tesis licenciatura., FMVZ., UNAM., México D.F..
- 2.- Andrews C., Pereira N.G., Wild P., 1978., Virus of vertebrates., Pp 100-102.
- 3.- Anuario estadístico de los Estados Unidos Mexicanos 1984., Censo demográfico porcino., Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática., México D.F..
- 4.- Binns M.R., 1978., Sheep erythrocyte rosettes in pigs, sheep, cattle and goats demonstrated in the presence of dextran., Journal of Immunological Methods., 21: 197-210.
- 5.- Blood C.D., Henderson A.C., Radostits M.O., 1983., Capítulo 21., Cólera Porcino en: Medicina Veterinaria., Quinta edición., Editorial Interamericana., México D.F., Pp 621-627.
- 6.- Bustos F.J.M., Stephano H.A., 1985., Cólera Porcino (I)., Síntesis Porcina., 3 (12): 8-11.
- 7.- Bustos F.J.M., Stephano H.A., 1985., Cólera Porcino (II)., Síntesis Porcina., 4 (1): 33-36.

- 8.- Carbrey E.A., Stewart W.C., Young S.H., 1966., The changing picture of hog cholera: Case of studies., J.A.V.M.A., 149 (12): 1720-1724.
- 9.- Carbrey E.A., Stewart W.C., Kresse J.I., Snyder M.L. 1980., Persistent hog cholera infection detected - during virulence typing of 135 field isolates., Am.J. Vet.Res., 41 (6): 946-949.
- 9'.- Charley B., Gorthier G., Houdayer M., Rouze P., 1980 Modifications des reactions immunitaires au cours de la peste porcine classique., Ann. Rech. Vét., 11 (1) 27-33.
- 10.- Cisneros Morales M.I., 1985., Valores normales de - las subpoblaciones de linfocitos en cerdos de 1,2,3 y 10 semanas de edad., Tesis licenciatura., FMVZ., UNAM., México D.F..
- 11.- Coggins L., 1964., Study of hog cholera colostral - antibody and its effects on active hog cholera immunization., Am. J. Vet. Res., 25 (106) : 613-617.
- 12.- Correa Girón P., 1981., Cólera Porcino en: Enfermedades virales de los animales domésticos (monogástricos)., Vol I., Tercera edición., Pp 7-28., México - D.F..
- 13.- Correa Girón P., 1984., Importancia de la inocuidad y potencia de los productos contra el cólera porcino.

- Memorias de la reunión de investigación pecuaria - 1984., México D.F., Octubre Pp 139-141.
- 14.- Corthier G., Galicher C., Gelfi J., 1976., Swine fe ver: Influence of passive immunity on pig immune res ponse following vaccination with a live virus vac cine (thriverval strain)., Ann. Rech. Vétér., 7 (4): 361-372.
- 15.- Corthier G., Labadie J.P., Petit E., 1977., Réson se immunitaire humorale cellulaire du porc consécu tive á la vaccination ou a l'infection sub-clinique par le virus de la peste porcine classique., Bull. - Acad. Vét de France., 50 : 425-433.
- 16.- Corthier G., 1978., Cellular and humoral immune res ponse in pigs given vaccinal and chronic hog cholera viruses., Am. J. Vet. Rech., 39 (11): 1841-1843.
- 17.- Desmecht M., Charlier G., Van Lierde H., Leunen J., 1977., Contrôle d'activeté du vaccin lapinisé de la peste porcine., Ann. Med. Vét., 121: 567-572.
- 18.- Dunne W., Howar., 1970., Section I, Viral Diseases., chapter 7 "Hog Cholera" in: Diseases of swine., Third edition., Edited by Howar W.Dunne., University Press Ames, Iowa. USA., 177-239.
- 19.- Emerson J.L., Delez A.L., 1965., Cerebellar hipopla sia, hypomyeliogenesis and congenital tremors of pigs

- associated with prenatal hog cholera vaccination of sow., J.A.V.M.A., 147 (1): 47-54.
- 20.- Emerson J.L., Delez A.L., 1965., Prenatal hog cholera infection a potential source of hog cholera., J.A.V.M.A., 147 (12): 1346-1349.
- 21.- Escajadillo C., Binns M.R., 1975., Rosette formation of pig T lymphocytes with sheep erythrocytes., Int. Arch. Allergy appl. Immun., 49: 325-331.
- 22.- Ewald S., Freedman L., Sander G.B., 1976., E A rosette-forming lymphoid cells in chickens: specificity of the Fc receptor and its relationship to surface antigens., Immunology., 31: 847-853.
- 23.- Fraire Cachón M., 1980., Detección precoz por inmunofluorescencia de virus de Cólera Porcino en leucocitos de cerdos infectados., Tesis licenciatura., FMVZ., UNAM., México D.F..
- 24.- Fudenberg H.H., Stites P.D., Stobo D.J., Wells V.J. 1983., Inmunología básica y clínica., Cuarta edición Editorial El Manual Moderno S.A. de C.V., México D.F.
- 25.- Gmelin-Meyling F., Dollekamp B.J., Zeger M.J., Ballieux E.R., 1980., Lymphocytes subpopulations in neonates, young children and adults as detected by six cell surface markers., Acta. Paediatr. Scand., 69 : 13-19.

- 26.- Hagan W.A., Bruner D.W., Gillespie J.H., 1970., En fermedades infecciosas de los animales domésticos., Editorial Prensa Médica Mexicana., 889-901.
- 27.- Hernández Baumgarten E., 1983., Características del virus de Cólera Porcino., Symposium sobre el Cólera Porcino en México., Santa Ana Tecamac, Sep. 9 y 10., Pp 5-8.
- 28.- Higgins A.D., 1981., Markers for T and B lymphocytes and their application to animals., Veterinary Bulletin., 51 (12): 925-944.
- 29.- Jubb F.V.K., Kennedy C.P., 1970., Hog cholera in: Pathology of domestic animal., Appendix 668-671 Vol. II., Academic Press., New York and London.
- 30.- Kamijo Y., Onkumas., Shimizu M., Shimizu Y., 1977., Differences in pathogenicity and antigenicity among hog cholera virus strains., Nat. Inst. Anim. Hlth. - Quart., 17: 133-140.
- 31.- Lai S.S., Chen W.C., Huang T.H., 1980., An immunodiffusion test for detection of hog cholera virus antibodies in swine serum., J. Chinese Soc. Vet. Sci., 6 83-86.
- 32.- Liess B., 1981., Chapter 25., Hog cholera, in: Virus diseases of food animals., Vol.II Diseases Monographs Academic Press inc (London) LTD., 627-650.

- 33.- Maqueda A.J.J., 1985., Algunos errores frecuentes en la vacunación contra el cólera porcino y calendarios de vacunación sugeridos para la república mexicana., Avances en Enfermedades del cerdo 1985., México D.F..
- 34.- Mengeling W.L., Packer R.A., 1969., Pathogenesis of chronic hog cholera host response., Am.J.Vet.Res., - 30 (3): 409-417.
- 35.- Mierzejewska M., Tereszczu K.S., Corthier G., Aynaud J.M., 1977., Peste porcine classique influence des anticorps passifs d'origine colostrale sur la réponse inmunitaire du porcelet consecutive a la vaccination avec l'aide de la such lapinice dite "Chinoise" Ann.Resch.Vét., 8 (3): 227-240.
- 36.- Mora Gutiérrez L., 1983., Normas mínimas de calidad en la elaboración de vacunas contra el cólera porcino., Symposium sobre el cólera porcino en México., Santa Ana Tecamac. Sep. 9 y 10., Pp 22-25.
- 37.- Morilla González A., 1983., Mecanismos de resistencia del lechón., Porcira., 95: 58-64.
- 38.- Neundorf R., Seidel H., Peste porcina en: Enfermedades del cerdo., Capitulo 12. 603-617., Editorial - Acribia Zaragoza (España).
- 39.- Cirschot J.T., Van Terpstra G., 1977., A congenital

- persisten swine fever infection I. Clinical and virological observation., Vet. Microbiol., 2: 121-132.
- 40.- Oirschot J.T., 1977., A congenital persisten swine-fever infection II. Immune response to swine fever - and unrelated antigens., Vet. Microbiol., 2: 133-142.
- 41.- Outteridge M.P., Binns M.R., Licence T.S., 1982., Subpopulation of pig blood E-rosette-forming lymphocytes and thymus-dependent null cells: Separation by nylon woll columns, rosette formation and macrophage-dependent mitogen and responsive ness., International Archives of Allergy and applied Immunology., 67:18-24
- 42.- Pilchard E.I., 1966., Hog cholera lesion in swine - given modifeed vaccine., J.A.V.M.A., 148(1): 48-51.
- 43.- Ramírez Necoechea R., 1983., Aspectos clínicos del cólera porcino., Symposium sobre el cólera porcino - en México., Santa Ana Tecamac, Sep 9 y 10., 9-13.
- 44.- Rodríguez Heres G.A., 1983., Epizootiología del cólera porcino en México., Symposium sobre el cólera - porcino en México, Santa Ana Tecamac, Sep. 9 y 10., Pp 1-2.
- 45.- Salmon H., 1982., Caracterizacion of pig lymphocytes receptor for allogeneic and non-allogeneic erythrocyte. I. Apparent common identity of both receptors., Clí. exp. Immunol., 48: 25-30.

- 46.- S.A.R.H., 1983., Decreto por el que se declaran zonas libres del cólera porcino los 58 municipios del norte de Sonora., SARH. Diario Oficial., Lunes 10 de Enero de 1983. Hoja 6.
- 47.- Shumizu M., Pan C.I., Hess R.W., 1976., T and B lymphocytes in porcine blood., Am.J.Vet.Res., 37 (3) : 309-319.
- 48.- Sreeraman P.K., Rao R.P., Janardhana P.K., Reddy R. M., Sreeraman Murthy A., Sastry., 1979., Cytochemical studies on the peripheral blood leukocytes of swine before and after- hog cholera vaccination., Indian Vet. Journal., 56: 825-830.
- 49.- Stewart W.C., Carbrey E.A., Jenney E.W., Brown B.S. Kresse J.I., 1971., Bovine viral diarrhoea infection in pig., J.A.V.M.A., 159 (11): 1556-1563.
- 50.- Stewart W.C., Downing D.R., Carbrey E.A., Kresse J. I., Synder M.L., 1979., Thermal inactivation of hog cholera virus in ham., Am.J.Vet.Res., 40 (5): 739-741.
- 51.- Terpstra C., Robijns K.G., 1977., Experience with - regional vaccination against swine fever in enzootic areas for limited periods using e strain virus., Tijdschr diergeneesk., 102 (2): 26-32.
- 52.- Tielen M.J.M., Vanbekkum J.G., Robijns K., Brus D.H. J., 1980., Resultados sobre investigaciones de efec-

tos secundarios en el uso de vacuna contra el cólera porcino cepa China efectuados en Holanda.

- 52'.- Wardley R.C., and P.J. Wilkinson., 1977. (Reed 1978)
The association of African swine fever virus with -
blood components of infected pigs., Arch Virol 55 (4)
327-334.
- 53.- Weide D.K., Sanger V.L., Lagace A., 1962., Inocula-
tion of baby pigs with lapinized hog cholera vaccine
(1ml)., J.A.V.M.A., 141 (4): 464-469.
- 54.- Weide D.K., Sanger V.L., 1962., Inoculation of baby
pigs with lapinized hog cholera vaccine (2-4 ml).,
J.A.V.M.A., 141 (4): 470-475.
- 55.- Zarate Celedón I., 1976., Variaciones en la cuenta-
leucocitaria de cerdos sanos inoculados con cepa Chi
na de Cólera porcino., Tesis licenciatura., FMVZ.,
UNAM., México D.F..