

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. **Boucias, D.G.; Shoburg, E.A.; Allen, G.E.** 1982. The relative susceptibility of six noctuid species to infection by *Nomuraea rileyi* isolated from *Anticarsia gemmatilis*. J. Invert. Pathol. 39:238-240.
2. **Boucias, D.G.; Bradford, D.L.; Barfield, G.S.** 1984. Susceptibility of the velvetbean caterpillar and soybean looper (Lepidoptera: Noctuidae) to *Nomuraea rileyi*: Effects of pathotype, dosage, temperature and host age. J. Econ. Entomol. 77:247-253.
3. **Bustillo, A.E.; Franco, G.J.** 1986. Parasitismo en larvas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) en cultivos de maíz. XIII Congreso de Socolem, Resúmenes. Cali, p. 39.
4. **Ignoffo, C.M.; Putler, B.; Hostetter, D.L.; Dickerson, W.A.** 1976. Susceptibility of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*, and the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*, to several isolates of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. J. Invert. Pathol. 28:259-262.
5. **Ignoffo, C.M.** 1981. The fungus *Nomuraea rileyi* as a microbial insecticide. In: Microbial control of pest and plant diseases 1970-1980 ed. H.D. Burges, p. 513-538. Acad. Press, London, 914 p.
6. **Posada, F.J.; Bustillo, A.E.** 1986. Patogenicidad de un aislamiento de *Nomuraea rileyi* sobre larvas del cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda*. Rev. Col. Ent. v. 12(1):5-15.
7. **Puttler, B.; Ignoffo, C.M.; Hostetter, D.L.** 1976. Relative susceptibility of nine caterpillar species to the fungus *Nomuraea rileyi*. J. Invert. Pathol. 27:269-270.
8. **Thomas, C.M.; Poinar Jr., G.O.** 1973. Report of diagnoses of diseased insects 1962-1972. Hilgardia. 42:1-359.
9. **Torres, S.; Uribe, A.** 1985. Reconocimiento e identificación de enemigos naturales del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), en el departamento de Antioquia. Tesis, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, 107 p.

MEDICINA VETERINARIA

RESPUESTA INMUNE EN BOVINOS A PROTEINAS ESTRUCTURALES DEL VIRUS DE LA RINOTRAQUEITIS INFECCIOSA BOVINA (RIB)

Esperanza Rueda de Clavijo; Olga C. Mariño*

RESUMEN

Se realizó el seguimiento de las poblaciones de leucocitos mononucleares circulantes en bovinos, obtenidas mediante gradiente de densidad y se evaluó su respuesta al estímulo ocasionado por la inoculación de una vacuna a virus vivo modificado y de un antígeno de subunidades proteicas de membrana del virus de la RIB. Los marcadores celulares seleccionados fueron los de inmunoglobulinas de superficie (Igs) para linfocitos B, formación de rosetas "E" para linfocitos T y la capacidad fagocítica para monocitos. Tres grupos de bovinos denominados grupo 1, grupo 2 y control fueron sangrados durante 18 días para el establecimiento de los niveles celulares básicos. Posteriormente los animales del grupo 1 fueron vacunados vía intranasal con vacuna viva y los animales del grupo 2 con antígeno de subunidades proteicas en adyuvante por vía intramuscular. A continuación se siguió la evaluación celular durante un mes, período al cabo del cual los animales fueron desafiados vía intranasal con virus vivo virulento y evaluados durante 20 días, para un total

* Microbióloga M.S. y Microbióloga M.S., Ph.D. Programa de Microbiología. Laboratorio de Investigaciones Médicas Veterinarias LIMV. ICA, A.A. 29743. Bogotá, Colombia.

de 67 muestreos. Se encontró que la vacunación con el antígeno de subunidades indujo elevación en la concentración linfoide Y y en la capacidad fagocítica, mayor conversión serológica y manifestaciones clínicas menos severas después de la vacunación y el desafío, así como neutralización del virus a nivel local. Lo anterior, unido a la eliminación del riesgo de diseminación e inducción de latencia viral demostró la mejor calidad del estímulo, sobre la vacuna de virus vivo. Se considera importante profundizar en el estudio de marcadores celulares más específicos y el seguimiento de las actividades citotóxica y blastogénica para la evaluación integral de la capacidad protectora de estos sistemas de vacunación.

Palabras Claves Adicionales: Virus herpes bovino-1, antígeno, inmunidad celular.

ABSTRACT

Bovine Immune Response to Structural proteins of Bovine Rhinotracheitis Virus

Cellular aspects of immune response to infectious bovine rhinotracheitis (IBR) virus infection were evaluated through the quantitation of mononuclear cell population from bovine peripheral blood, isolated by density gradient method. The cellular differential markers used were, surface immunoglobulin (Igs) for B-lymphocytes, the formation of "E" rosettes for T-lymphocytes and phagocytic activity for monocytes. Eleven animals distributed in three groups named, control, group 1 and group 2, were monitored one day apart during 18 days, in order to establish basic cellular levels. Afterwards, groups 1 and 2 were vaccinated intranasally with viral purified membrane antigen respectively, and the same parameters evaluated during a month; subsequently, the groups were challenged with live virulent IBR virus and evaluated for an extra 20 days period, up to a total of 67 samplings. Following vaccination and challenge, group 2 showed high T-lymphocytes and phagocytic activity values, as well as severe clinical signs suggesting that the purified antigen stimulus was better than that produced with the live vaccine. Higher antibody titers and serological conversion in animals from this group as well as reduced risk of virus dissemination and latency confirmed the former conclusion. Complementary, experiments for the evaluation of the protective capacity of this vaccination approach are considered of special importance.

Additional Index Words: Bovine herpes virus-1, antigen, cellular immune response.

El virus de la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (RIB), o herpes bovino tipo-1, pertenece a la familia *Herpesviridae* (26) y como tal, induce una respuesta inmune compleja, ya que el desarrollo de protección requiere niveles de anticuerpos locales y circulantes (19, 21, 35) y células linfoides sensibilizadas. Sólo su acción conjunta logra la des-

trucción de la célula infectada y evita la característica infección latente (23, 27).

Los anticuerpos contra el virus de la RIB limitan, **in-vitro**, la diseminación viral por el mecanismo de "citotoxicidad dependiente de anticuerpos" (6, 11, 22). No obstante, los anticuerpos hu-

morales parecen jugar un papel menor, ya que los virus herpes pueden infectar a través de puentes intercelulares, evadiendo así las defensas humorales y haciendo que la respuesta inmune mediada por células sea el frente de defensa en la infección (7, 19).

Los linfocitos T efectores median, **in-vitro**, la lista de las células infectadas (9, 32) cuando se suministran las señales celulares accesorias y las interleukinas apropiadas (24, 30, 31). Sin embargo, en bovinos la variedad de mecanismos citotóxicos efectores a la infección causada por herpes sólo se conoce parcialmente (6), considerándose que no es necesaria la restricción genética de la respuesta citotóxica (22); que la citotoxicidad natural corresponde a las células Null y PNA (+) tipo linfocito T (17), y se propone la supresión de la replicación viral por bloqueo más que su destrucción (9, 27, 33). Además, se considera como indispensable el apoyo de los sistemas fagocítico mononuclear y polimorfonuclear (10, 22, 30); los mecanismos inespecíficos mediados por estas células son altamente eficientes y las interleukinas producidas (IL-1 e interferon B) aumentan la citotoxicidad de linfocitos T (2, 14). Sin embargo, se ha comprobado alta susceptibilidad de los macrófagos a la infección y replicación viral (10, 11, 19), con daño en la actividad fagocítica y alteración de los mecanismos de defensa pulmonar, facilitando la infección bacteriana secundaria (5, 7).

Aun cuando en bovinos no se conocen los marcadores fenotípicos de todas las poblaciones celulares involucradas en el estímulo antigénico, el seguimiento de marcadores como: roseta "E" (linfocitos T), inmunoglobulinas de superficie (linfocitos B) y capacidad fagocítica de monocitos, como en la respuesta inmune (4, 5, 13), representan un intermedio entre los procedimientos de investigación sofisticados y los más prácticos para análisis masivos que conservan alta especificidad. Además, se buscó conocer mejor el comportamiento de estas células después de estimular por vacunación a un grupo de bovinos con virus RIB modificado o con antígeno estructural de subunidades proteicas de membrana. Simultáneamente, se evaluó la protección a la infección inducida por cada uno de estos antígenos, desafiando con virus patógeno.

MATERIALES Y METODOS

Animales:

Se trabajó con once machos de dos a tres años de edad y de raza criolla, procedentes de Gachetá (Cundinamarca), municipio localizado a 1800 m.s.n.m., los cuales fueron seleccionados con base en la evaluación de los resultados de exámenes clínicos y serológicos individuales para asegurar reacción negativa a RIB, parainfluenza 3, diarrea viral bovina, fiebre aftosa y leucemia bovina.

Los animales fueron mantenidos en estabulación en las instalaciones del Laboratorio de Investigaciones Médicas Veterinarias (LIMV) en Bogotá, bajo condiciones de alimentación y manejo conocidas y homogéneas. Evaluaciones clínicas, toma de temperatura y observación de presencia de secreciones fueron realizadas diariamente. Los bovinos se distribuyeron por selección al azar (34) en tres grupos experimentales, identificados así:

Grupo 1: Conformado por cuatro animales. Posteriormente vacunado con virus vivo atenuado por vía intranasal (IN).

Grupo 2: Conformado por cuatro animales. Posteriormente inoculado con antígeno de subunidades proteicas estructurales por vía intramuscular (IM).

Grupo 3: Control no inoculado, conformado por tres animales.

Obtención de las Poblaciones Leucocitarias Mononucleares

Las células mononucleares se obtuvieron a partir de 40 ml de sangre periférica anticoagulada con EDTA al 10%, aplicando el método de gradientes de densidad continua, preformados en Percoll* al 60% en solución salina 0.15 M, sometidas a centrifugación isopícnica (28). Las capas correspondientes a las poblaciones mononucleares (entre $r = 1.062$ y 1.064) se ajustaron a una concentración de $2-3 \times 10^6$ células/ml, con solución amortiguadora salina de fosfatos (SSA), 0.1 M, pH 7.2.

* Pharmacia Fine Chemicals – AB-S751 82. Uppsala, Suecia.

Caracterización de Poblaciones

Población fagocítica mononuclear

Esta población se determinó enfrentando 1.0 ml de la población aislada del gradiente, en concentración de 1×10^6 células/ml a 0.25 ml de rojo neutro al 0.05% en tampón Tris HCL 0.004 M, pH 7.2 y 0.85% de NaCl durante una hora a 37°C, estableciendo posteriormente, mediante montaje en fresco y microscopía de luz, el porcentaje de células mononucleares fagocíticas cuyo citoplasma presentó colorante activamente integrado (28).

Poblaciones linfoides T y B

La caracterización de la población linfoide T se realizó mediante la técnica de formación de rosetas no inmunes "E", con glóbulos rojos de oveja (3, 4), con una concentración celular prepurificada de $2-3 \times 10^6$ células/ml. El porcentaje de linfocitos B se estableció mediante el método de fluorescencia directa para células portadoras de inmunoglobulinas como marcadores de superficie (3, 15).

Diseño Experimental

Para establecer los niveles básicos de las concentraciones linfoides T y B, y establecer la actividad fagocítica de los monocitos en individuos no estimulados, los animales de los tres grupos fueron sangrados mediante punción yugular cada tercer día por un período de 17 días, completando nueve muestras para los grupos 1 y 2, y 18 para el grupo control³. Establecidas las concentraciones celulares básicas, los animales fueron inoculados con los antígenos respectivos y posteriormente, cada tercer día, les fueron tomadas muestras de sangre con el propósito de evaluar los parámetros celulares, completando de esta manera 15 muestreos. Posteriormente los bovinos se aislaron y desafiaron vía intranasal (IN) con la cepa virulenta RIB Colombia 5946-1973 (36) y cada tercer día, durante 20 días, se les tomaron muestras de sangre hasta completar en esta etapa un total de 10 muestras por animal.

Grupo 1. Cepa vacunal

Se empleó la cepa vacunal viva atenuada Jensen Salsbury* con título 10^4 (Dosis infectante cultivo de tejido 50%) DICT 50/ dosis, vía IN. Además de las evaluaciones celulares, se controló la reactividad serológica a RIB mediante la prueba de microseroneutralización en cultivo celular (Madin-Darby Bovine Kidney) MDBK (35,36). La prueba de desafío se efectuó un mes postinmunización, vía IN con 10^4 DICT 50/dosis de la cepa virulenta. Se tomaron muestras de secreción nasal para intentar el aislamiento de virus durante las etapas postvacunal y postdesafío.

Grupo 2. Antígeno estructural

Los bovinos fueron inoculados por vía intramuscular con antígeno estructural proteico purificado a partir de la cubierta viral (29) de la cepa Jensen Salsbury, en una concentración de 1 mg/ml/animal y emulsionado con adyuvante completo de Freund**. Los animales se infectaron y evaluaron clínica y celularmente de igual forma que el grupo 1. También se les tomaron muestras nasales durante las dos etapas, con el fin de intentar el aislamiento viral.

Grupo 3. Control

Durante la realización de los esquemas de inmunización de los grupos 1 y 2, las poblaciones celulares del grupo control fueron analizadas simultáneamente; también se realizaron análisis clínicos y serológicos con igual periodicidad.

Análisis Estadístico

Los valores porcentuales de las concentraciones celulares fueron promediadas y obtenidas las desviaciones estándar. Para el análisis de varianza (ANAVA), bloques al azar con arreglo factorial y las pruebas de comparación múltiple de Duncan entre grupos y entre etapas, se empleó la transformación matemática ArcoSeno, donde $X1 = \text{ArcoSeno} \sqrt{x/100} .57.295$, donde X = porcentaje del parámetro, con el fin de normalizar la distribución de los datos (34). Adicionalmente se hizo el análisis de regresión lineal.

* Proporcionada por el Dr. B.C. Easterday. Dept. Vet. Wisconsin, Madison 53706. USA.

** Sigma Chemical Company. 14508, St. Louis. MO. 63178. USA.

RESULTADOS Y DISCUSION

Observaciones Clínicas

Durante la etapa de evaluación básica los animales mantuvieron condiciones clínicas homogéneas sin indicativos de estados infecciosos y serología negativa para RIB. En la Tabla 1 se resumen las observaciones de la etapa postvacunal las cuales concuerdan con las descritas en la literatura en cuanto a los resultados de los diferentes sistemas de inmunización contra RIB. Según éstos, la aplicación vía IN, de vacunas vivas modificadas como la empleada en los bovinos del grupo 1, si bien inducen algunos signos clínicos laterales, parece tener mejores efectos en la inducción de inmunidad tanto celular como local y sobre la producción de interferón, además de conferir títulos de anticuerpos neutralizantes después de una reestimulación (8, 12, 21). Sin embargo, los animales así inmunizados son una fuente de excreción y difusión viral y existen evidencias que demuestran un mayor riesgo de latencia viral en el tejido nervioso, después de la vacunación (18, 26). En contraste, la ausencia de signos clínicos en el grupo 2 confirma que las vacunas inactivadas son seguras e inofensivas, con la ventaja particular de garantizar la no diseminación del virus al campo (8, 12, 19).

Como se deduce de la Tabla 1, en el período postdesafío se confirma la deficiente estimulación antigénica en el grupo 1 sugiriendo que, a pesar de esperarse una respuesta local con capacidad inhibidora de replicación viral en el desafío por parte de los animales vacunados vía IN, ésta no fue tan eficaz como la lograda cuando se vacunó vía IM con antígeno de subunidades proteicas (20, 35).

Estas observaciones también sugieren el establecimiento de una inmunidad general de máxima calidad en los animales del grupo 2 con producción de inmunidad local, la cual se creía que sólo era producida por estímulos locales (8, 20, 33).

Etapa de Evaluación Básica

Este período de medición permitió obtener un conocimiento de valores porcentuales normales y un acercamiento a los valores promedios para las condiciones experimentales particulares (Tabla 2).

TABLA 1. Resumen de observaciones en los animales del Grupo 1 (vacuna viva, IN) y Grupo 2 (vacuna subunidades, IM) en las etapas postvacunación y desafío.

	Post vacunación			Post desafío		
	Animales con signos clínicos (No./total) o Temperatura reacción	Animales con seroconversión [] (No./total)	Aislamiento viral f (No./total)	Animales con signos clínicos (No./total) o Temperatura reacción	Animales con seroconversión [] (No./total)	Aislamiento viral f (No./total)
Grupo 1	1/4 Día 2 Moderada	4/4 Día 30 Título 1:2	4/4	4/4 4/4 Severa**	1/4 Día 20 Título 1:2	3/4 Días 4 a 7
Grupo 2	0/4	0/4	0/4	1/4 Moderada	4/4 Día 6	1/4 Días 4 a 7

o: Rectal superior a 38,5° C.

* Secreción nasal, lagrimal, congestión.

** Además, conjuntivitis, disnea, inapetencia.

[]: Anticuerpos seroneutralizantes.

f: Comprobación por inhibición específica de efecto citopático en cultivo celular MDBK.

TABLA 2. Parámetros celulares obtenidos durante la etapa de evaluación básica en los grupos experimentales.

Identificación	Parámetros (%)		
	Fagocitosis ($\bar{X} \pm D.E.$)	Linfocitos T ($\bar{X} \pm D.E.$)	Linfocitos B ($\bar{X} \pm D.E.$)
GRUPO 1 Transformación* n** = 9	19.07 \pm 0.93 (25.89)	19.04 \pm 0.38 (25.86)	12.78 \pm 0.88 (20.94)
GRUPO 2 Transformación n ₂ = 9	20.96 \pm 0.74 (27.24)	19.25 \pm 0.45 (26.01)	11.54 \pm 0.57 (19.85)
GRUPO CONTROL Transformación n = 18	19.71 \pm 0.33 (26.35)	18.54 \pm 0.76 (25.50)	13.34 \pm 0.65 (21.41)
Total X Transformación n = 36	19.91 \pm 0.96 (26.49)	18.00 \pm 0.36 (25.79)	12.55 \pm 0.92 (20.74)

* Transformación empleada para análisis estadísticos: $ArSen \sqrt{\% / 100}$. (57.295).

** Número de muestreos por grupo.

Existe un amplio rango de valores consignados en la literatura (4, 13, 22) para poblaciones mononucleares en bovinos, y es aún variado y difícil el empleo de marcadores para ellas; actualmente se están identificando por medio de anticuerpos monoclonales (9). Se considera que los valores obtenidos con las técnicas elegidas en el presente trabajo pueden, a pesar de su simplicidad, orientar sobre las variaciones de estos valores, producidas por estímulos antigénicos diversos, o debidas a diferentes formas de presentación de un mismo antígeno al sistema inmune.

El estudio estadístico de ANAVA, así como las pruebas de Duncan para el grupo control a través de todo el experimento, se registran en la Tabla 3. Las diferencias estadísticamente significativas encontradas (Tablas 3 y 4) demostraron que existen factores externos (manejo, nutrición, variación individual) que influyen en la determinación de valores normales y, por lo tanto, los resultados deben evaluarse sin desconocer su participación. Por esta razón, las diferencias se tomaron como variación de fondo preestimulación, dentro de un rango biológicamente aceptable. La depuración futura de las metodologías, tales como selección exclusiva de cada población obviará en parte esta dificultad, pero ello posiblemente limitará la funcionalidad experimental, ya que aumentarán tanto el tiempo de realización como el costo de las pruebas.

Las concentraciones celulares de los animales del grupo control obtenidas en esta etapa se compararon estadísticamente con las correspon-

dientes a los animales de los grupos 1 y 2 durante la vacunación y el desafío, incluyéndose la relación entre variaciones debidas a las vacunaciones o al desafío, o producidas por causas ajenas a estos tratamientos (Tabla 5).

Etapa de Vacunación

Teniendo como base los valores normales establecidos en la etapa preestimulación, se observaron diferencias en el comportamiento de las células evaluadas, las cuales respondieron en la medida en que fueron afectadas por la característica antigénica del estímulo y la vía de inoculación.

Los ANAVA realizados entre los grupos de bovinos y entre las etapas experimentales, comprueban que se presentaron diferencias altamente significativas en relación con la estimulación producida por cada una de las dos vacunas empleadas (Tablas 3 y 4), a nivel de concentraciones linfoides T y B, confirmado por el análisis de interacción "tratamiento por lectura" (Tablas 5, 6 y 7). La actividad fagocítica continuó mostrando variaciones significativas, las cuales se habían establecido desde la etapa básica, pero el análisis de la interacción fue negativo para este parámetro. El hecho de no encontrar afectada negativamente la actividad fagocítica en ninguno de los dos grupos (Figura 1) durante la etapa de vacunación y establecerse estimulación de la población linfóide T de los animales del grupo 2 (Figura 1) en la misma etapa, se interpretó como la evidencia de presentación antigénica ventajosa o de me-

TABLA 3. Grupo control. Análisis de varianza (ANAVA) y prueba de Duncan de los valores promedios obtenidos para los parámetros en estudio.

Prueba	Parámetros (%)		
	Fagocitosis (\bar{X})	Linfocitos T (\bar{X})	Linfocitos B (\bar{X})
ANAVA			
Significancia (α)	** (0.0006)	** (0.0019)	** (0.0140)
DUNCAN			
A. Etapa básica n = 27	26.340	25.474	21.364
B. Etapa vacunación n = 45	26.528	26.203	22.381
C. Etapa desafío n = 30	25.667	25.601	21.541
Comparación entre: Etapas ^o ($\alpha=0,05$)	$\bar{B} \bar{A}, C$	$B, \bar{C} \bar{A}$	$B, \bar{C} \bar{A}$

Transformación empleada: $ArSen \sqrt{\% / 100}$. (57.295); n = Número de lecturas por etapa;
^o = Promedios asociados por barras no son estadísticamente diferentes .

** Altamente significativo.

TABLA 4. Análisis de varianza (Anava) y pruebas de Duncan de los valores promedios obtenidos en los Grupos 1 y 2.

Prueba	Grupo	Parámetros (%) []		
		Fagocitosis (\bar{X})	Linfocitos T	Linfocitos B (\bar{X})
ANAVA				
Significancia (α)	1	** (0.001)	** (0.0009)	** (0.0001)
	2	** (0.0001)	** (0.0001)	* (0.0001)
DUNCAN				
A. Etapa básica (n = 36)	1	26.862	25.864	20.899
	2	27.226	27.746	29.994
B. Etapa vacunación (n = 60)	1	26.823	26.536	23.715
	2	31.221	31.279	21.011
C. Etapa desafío (n = 40)	1	24.682	25.552	28.921
	2	28.479	31.570	23.784
ϕ Comparación entre etapas	1	$\bar{B} \bar{A}, C$	$B, \bar{A} \bar{C}$	C, B, A
	2	B, C, A	C, B, A	A, B, C

[] = Transformación empleada: $ArSen \sqrt{\% / 100}$. (57.295); n = Número de lecturas por etapa; * Significativo; ** Altamente significativo; ϕ = Promedios asociados con barras no son estadísticamente diferentes.

TABLA 5. Etapa de evaluación básica, Análisis de varianza (Anava) y prueba de Duncan de los valores promedios para cada parámetro en los tres grupos de experimentación.

Prueba	Parámetros (%)		
	Fagocitosis (\bar{X})	Linfocitos T (\bar{X})	Linfocitos B (\bar{X})
ANAVA			
Tratamiento	** ($\alpha = 0.04$)	NS ($\alpha = 0.621$)	* ($\alpha = 0.025$)
Lectura	NS ($\alpha = 0.791$)	NS ($\alpha = 0.809$)	NS ($\alpha = 0.994$)
Trat. x Lec.	NS ($\alpha = 0.742$)	NS ($\alpha = 0.877$)	NS ($\alpha = 0.949$)
DUNCAN			
A. Grupo 1 n = 36	25.862	25.864	20.899
B. Grupo 2 n = 36	25.226	25.746	19.994
C. Grupo control n = 27	26.340	25.474	21.264
Comparación entre:			
Grupos ^o ($\alpha = 0.05$)	B, CA	A, B, C	CA AB

Transformación empleada: ArSen $\sqrt{\% / 100}$. (57.295); ^o = Promedios asociados por barras son estadísticamente diferentes.
 * Significativo; ** Altamente significativo.

TABLA 6. Etapa de vacunación, Análisis de varianza (Anava) y prueba de Duncan de los valores promedios para cada parámetro en los tres grupos de experimentación.

Prueba	Parámetros (%)		
	Fagocitos (\bar{X})	Linfocitos T (\bar{X})	Linfocitos B (\bar{X})
ANAVA			
Tratamiento	** ($\alpha = 0.0001$)	** ($\alpha = 0.0001$)	** ($\alpha = 0.0001$)
Lectura	NS ($\alpha = 0.6364$)	** ($\alpha = 0.0001$)	** ($\alpha = 0.0001$)
Trat. x Lec.	NS ($\alpha = 0.9409$)	** ($\alpha = 0.0001$)	** ($\alpha = 0.0020$)
DUNCAN			
A. Grupo 1 n = 36	26.823	26.536	23.715
B. Grupo 2 n = 36	31.221	31.270	21.011
C. Grupo control n = 27	26.528	26.203	22.381
Comparación entre:			
Grupo ^o ($\alpha = 0.05$)	B, A, C	B, C, A	A, C, B

Transformación empleada: ArSen $\sqrt{\% / 100}$. (57.295); n = Número de lecturas por grupo; ^o = Promedios asociados por barras no son estadísticamente diferentes; ** Altamente significativo.

TABLA 7. Etapa de desafío. Análisis de varianza (Anava) y prueba de Duncan de los valores promedios para cada parámetro en los tres grupos de experimentación.

Prueba	Parámetros (%)		
	Fagocitosis (\bar{X})	Linfocitos T (\bar{X})	Linfocitos B (\bar{X})
ANAVA			
Tratamiento	** ($\alpha = 0.0001$)	** ($\alpha = 0.0001$)	** ($\alpha = 0.001$)
Lectura	* ($\alpha = 0.0125$)	** ($\alpha = 0.0001$)	* ($\alpha = 0.0016$)
Trat. x Lec.	NA ($\alpha = 0.8935$)	** ($\alpha = 0.001$)	** ($\alpha = 0.0009$)
DUNCAN			
A. Grupo 1 n = 36	24.682	25.562	28.921
B. Grupo 2 n = 36	28.479	31.750	23.789
C. Grupo control n = 27	25.667	25.601	25.541
Comparación entre:			
Grupos ^o ($\alpha = 0.05$)	B, $\bar{C}\bar{A}$	B, $\bar{C}\bar{A}$	A, B, C

Transformación empleada: $\text{ArSen } \sqrt{\% / 100}$, (57,295); n = Número de lecturas por grupo; ^o = Promedios asociados por barras no son estadísticamente diferentes; ** Altamente significativo.

jor calidad por parte del macrófago (1, 10, 24), que la recibida por la misma población T en los animales del grupo 1. La presencia del adyuvante amplificó y mejoró la activación linfoide (8, 25, 33), influenciada por la vía de inoculación empleada, lo cual confirma la buena distribución de respuesta inmune (memoria) a nivel generalizado y local.

La población portadora de inmunoglobulinas de superficie presentó un comportamiento diferente durante esta etapa en los dos grupos experimentales (Figura 1). Los grados de estimulación parecen responder a las características antigénicas de cada inóculo en particular. La elevación de los linfocitos B en los animales del grupo 1, sin embargo, no coincide con la aparición de anticuerpos, posiblemente debido a que la determinación coincidió con una etapa intermedia del ciclo de maduración celular, en la cual la funcionalidad de las inmunoglobulinas aún no puede establecerse, no obstante ser estas células susceptibles a la inducción de blastogénesis en respuesta al antígeno específico (16, 33).

Etapa de Desafío Viral

El papel que las poblaciones linfoides estimuladas desempeñaron en la protección de los bovinos frente a desafío viral patógeno, evidenciado indirectamente por las técnicas elegidas, confirmó la baja estimulación de base que la vacunación con virus vivo atenuado ejerció sobre la población linfoide T (Tablas 4 y 7). Si bien, como se discutió

previamente, los animales del grupo 1 no presentaron respuesta local con capacidad inhibitoria, no obstante la replicación del virus vacunal y las manifestaciones clínicas, se consideró a partir de los resultados obtenidos que el macrófago debió interferir de alguna manera con la multiplicación viral, aun cuando fue afectado en su capacidad fagocítica (Figura 2), disminuyendo su acción de célula "presentadora" de antígeno al linfocito T, lo cual pudo contribuir a una menor capacidad para responder ante el enfrentamiento virulento (31).

En los dos grupos el comportamiento de los linfocitos T y B se modificó sensiblemente en esta etapa, como se comprueba en el análisis estadístico y en la regresión lineal (Figura 2). El descenso en la concentración de la población T circulante puede ser el reflejo de su utilización en el proceso activo de defensa en el área de impacto antigénico, o bien puede ser manifestación directa de la deficiencia de la capacidad presentadora de los macrófagos (11, 23, 31).

La actividad citotóxica de los linfocitos T en la protección frente al virus de la RIB es reconocida ampliamente (22); sin embargo, se ha observado que virus inactivados fallan en estimular la citotoxicidad y pueden no sensibilizar el animal para una adecuada respuesta secundaria (6, 23).

Esta situación se modifica cuando las vacunas de subunidades proteicas son incorporadas en

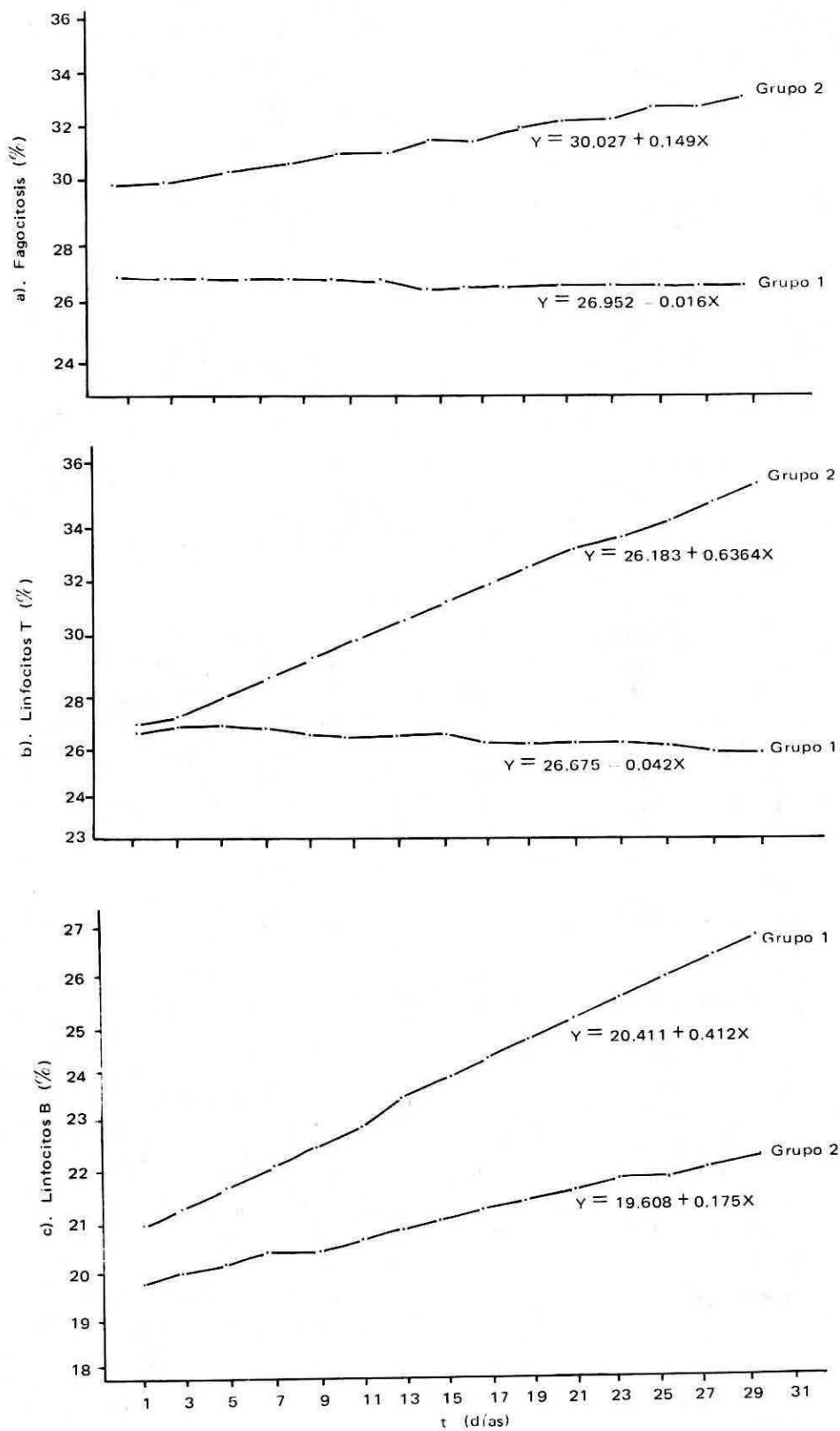


FIGURA 1. Curvas de tendencias según análisis de regresión para porcentajes de: a). Fagocitosis; b). Linfocitos T; c). Linfocitos B, de los grupos 1 y 2 durante la etapa de vacunación.

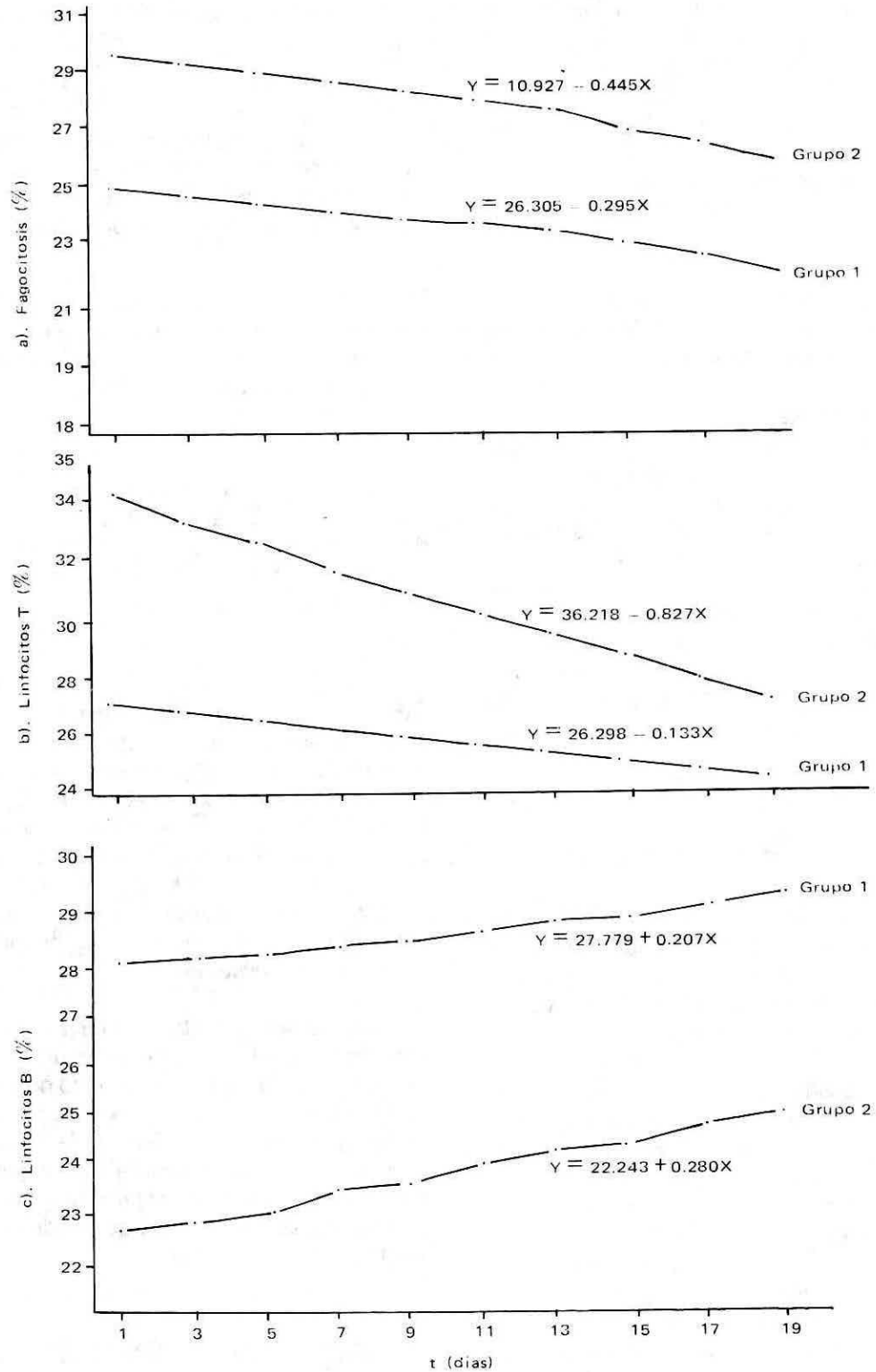


FIGURA 2. Curvas de tendencia según análisis de regresión para porcentajes de: a). Fagocitosis; b). Linfocitos T; c). Linfocitos B, de los grupos 1 y 2 durante la etapa de desafío viral.

adyuvante completo, ya que su acción se fundamenta en la estimulación directa de linfocitos T citotóxicos. Dado que la actividad citotóxica de los linfocitos no se evaluó en este experimento, sólo se puede asumir que su participación debió ser efectiva dado que la población aumentó en respuesta al desafío, para descender posteriormente, coincidiendo con la protección clínica, a diferencia de lo observado en los animales del grupo 1 vacunado con virus vivo atenuado.

El aumento obtenido en la concentración de la población linfocida B concuerda con los esquemas esperados para la respuesta primaria y anamnésica, en relación con el estímulo antigénico para los animales del grupo 1, a pesar de no detectarse niveles de anticuerpos, mientras que en el grupo 2 en el cual sólo se registró un leve aumento en esta población, los cuatro animales hicieron seroconversión hacia la mitad del período de desafío. Todo esto hace pensar que la presentación y vía de aplicación del estímulo antigénico de subunidades proteicas facilitaron las interacciones celulares necesarias de toma, procesamiento y presentación por parte de los monocitos hacia la población T adecuada, y fue co-responsable de la inducción de la protección celular específica.

CONCLUSIONES

Se demostró, mediante el seguimiento de las respuestas clínica, humoral y celular después del desafío viral, que el antígeno de subunidades proteicas, extraído de la membrana del virus de la RIB, posee una mayor efectividad inmunizante.

La vacunación con virus vivo atenuado, no obstante inducir protección contra la enfermedad, produjo mayores complicaciones clínicas y respuesta de anticuerpos circulantes de bajo título. Las manifestaciones clínicas menos severas, encontradas en el grupo de animales vacunados con el antígeno estructural, sugieren la utilización de éste en los programas de prevención y control de la enfermedad, máxime si se considera la garantía de no diseminación viral al campo.

Con base en lo anterior, se dedujo que la forma y vía de presentación del estímulo, frente a los componentes humorales y celulares del sis-

tema inmune, influyeron en la calidad de la respuesta y en el establecimiento y distribución de la memoria para la protección de los huéspedes estimulados.

Los valores obtenidos para las mediciones de capacidad fagocítica y marcadores de membrana durante el período básico (prevacunación), se tomaron como normales dentro de rangos de variación estadística y biológicamente aceptables.

Los ANAVA realizados después de la vacunación confirman la hipótesis previa, según la cual, la vía de inoculación o presentación del antígeno influye en la aceptación y procesamiento del mismo por parte del macrófago.

Se observó una mayor actividad fagocítica y elevación en la población linfocida T en los bovinos del grupo 2, vacunados por vía IM con antígeno estructural proteico, emulsionado en adyuvante completo de Freund.

La inclusión del antígeno purificado en adyuvante completo de Freund demostró su capacidad amplificadora de respuesta celular T, al estimular adecuadamente a las poblaciones celulares tanto a nivel local como sistémico, no obstante su aplicación vía IM. Según lo anterior, deben estudiarse esquemas de vacunación que empleen antígenos inactivados, incluidos en sistemas adyuvantes, con el propósito de producir respuesta protectora, inducir adecuada memoria inmune y reducir la carga viral en el campo.

El futuro seguimiento de la respuesta local de anticuerpos tipo IgA, la evaluación de la actividad y función del interferón y el estudio de la capacidad citotóxica y blastogénica de las poblaciones mononucleares linfocidas, frente a la infección por el virus de la RIB, contribuirán a un mejor conocimiento de la respuesta celular y de la acción protectora después de la vacunación con antígenos inactivados.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. **Abramson, S.L.; Brown, M.F.** 1983. Antigen presentation to human T-lymphocytes. *Cel. Immunol.* (USA) 76:379-389.

2. **Allison, A.C.R.** 1978. Mechanisms by which activated macrophages inhibit lymphocyte responses. *Immunol. Rev. (USA)* 40:3-27.
3. **Barta, O.** 1981. Laboratory techniques of veterinary clinical immunology: a review. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. (Inglaterra)*. 4:1-30.
4. **Belden, L.E.; McCroskey-Rothwell, M.K.; Strelkauskas, A.J.** 1981. Subpopulations of bovine lymphocytes separated by rosetting techniques. *Vet. Immunol. Immunopath. (Holanda)*. 2:467-474.
5. **Blanden, R.V.** 1983. Microbicidal activity of macrophages. *J. Reticuloendothelial Society. (Inglaterra)*. 34:289-297.
6. **Brigham, S.H.; Rossi, C.R.** 1986. Cell-mediated cytotoxicity of peripheral blood mononuclear cells stimulated *in-vitro* for infectious bovine rhinotracheitis virus-infected cells. *Vet. Immunol. Immunopath. (Holanda)*. 13:203-212.
7. **Campos, R.; Rossi, C.R.** 1985. Cell-mediated cytotoxicity of bovine mononuclear cells to IBR infected cells: dependence on Sephadex G-10 adherent cells. *Vet. Immunol. Immunopath.* 8:363-375.
8. **Congress International sur les Maladies du Betail. 11 a. Tel Aviv Israel, 20-23 octubre, 1980.** Inocuite et activite d'unvaccin inactive en adjuvant huileux contre la rhinotracheite infectieuse bovine. *Israel Scientific Editor.* 768 p.
9. **Eberle, R.; Russel, R.G.; Rouse, B.T.** 1981. Cell-mediated immunity to herpes simplex virus: recognition of type specific and type-common surface antigens cytotoxic T cell populations. *Infect. Immun.* 34:795-803.
10. **Forman, A.J.; Babiuk, L.A.** 1982. Effect of infectious bovine rhinotracheitis virus infections on bovine alveolar macrophage function. *Infect. Immun. (USA)*. 35:1041-1047.
11. **Forman, A.J.; Babiuk, L.A.; Misra, V.; Baldwin, F.** 1982. Susceptibility of bovine macrophages to infectious rhinotracheitis virus infection. *Infect. Immun. (USA)*. 35:1048-1057.
12. **Frerichs, G.N.; Woods, S.B.; Lucas, M.H.; Sands, J.J.** 1982. Safety and efficacy of live and inactivated infectious bovine rhinotracheitis vaccines. *Vet. Rec. (Inglaterra)*. 7:116-122.
13. **Hortwitz, D.A.; Bakke, A.C.** 1984. An Fc receptor-bearing third population of human mononuclear cells with cytotoxic and regulatory function. *Immunol. Today. (Holanda)*. 6:148-152.
14. **House, J.A.** 1980. Prevención y control de la rinotraqueitis infecciosa bovina. *Boletín Oficina Sanitaria Panamericana*. 88:35-44.
15. **International Convocation in Immunology. Ba. Amherst. New York.** 1982. Regulation of the immune response. Immunoregulation and the induction of expression of host-protective immune responses to parasites. *Karger. S., Basel. A.G.* 1983. p. 278-287.
16. **Kristensen, F.; Kristensen, B.; Lazary, S.** 1982. The lymphocyte stimulation test in veterinary immunology. *Vet. Immunol. (Holanda)*. 3:203-212.
17. **Lawman, M.J.P.; Rouse, B.T.; Courtney, R.J.; Walker, R.D.** 1980. Cell mediated immunity against herpes simplex induction of cytotoxic T lymphocytes. *Infect. Immun.* 27:133-139.
18. **Letchworth, G.J.; Carmichael, L.E.** 1982. Herpes virus 2 latency failure to recover virus from central sensory severe ganglia. *Can. J. Comp. Med. (Canadá)*. 46:76-79.
19. **Lucas, M.H.; Roberts, D.H.; Sands, J.J.; Westcott, D.G.** 1982. The use of bovine rhinotracheitis vaccine in a commercial veal unit: antibody response and spread of virus. *British Vet. J.* 138:23-28.
20. **Mann, D.D.; Buening, G.M.; Thorne, J.G.** 1983. Efficacy of aerosol, intranasal and intramuscular vaccination against selected bovine viral diseases. *Cornell Veterinarian. (USA)*. 73:375-379.
21. **Mariño, O.C.; Rueda de C., O.E.; Cotrino, V.; Diaz, I.** 1987. Respuesta humoral a rinotraqueitis infecciosa bovina evaluada por seroneutralización e inmunodifusión en ganado lechero vacunado. *Rev. ICA.* 22(1):22-29.
22. **Miller-Edge, M.; Splitter, G.** 1986. Patterns of bovine T cell mediated immune responses to bovine herpes-virus 1. *Vet. Immunol. Immunopath. (Holanda)*. 13:301-309.
23. **Onion, D.E.** 1983. The immune response to virus infection. *Vet. immunol. Immunopath. (Holanda)*. 13:301-309.
24. **Oppenheim, J.J.; Gery, I.** 1982. Interlukin 1 is more than an interleukin. *Immunol. Today. (Holanda)*. 3:113-119.
25. **Osebold, J.W.** 1982. Mechanisms of action by immunological adjuvants. *J.Am. Vet. Ass. (USA)*. 181:938-987.
26. **Pastort, P.P.; Thiry, E.; Vindecogel, H.** 1982. Problems in the latency period following vaccination against infectious bovine rhinotracheitis virus, bovine herpes virus-1. *Developments Biological Standarization. (USA)*. 52:455-461.

27. **Rodriguez, L.L.; Homan, J.; Easterday, B.C.** 1984. Characterization of bovine herpes virus-1 isolated from trigeminal ganglio of clinically healthy cattle. *Am. J. Vet. Res.* 45:1069-1062.
28. **Rueda de Clavijo, O.E.; Viáfara, N.E.; Mariño, O.C.** 1987. Separación de células mononucleares linfoides por centrifugación isopícnica. *Rev. ICA.* 21(1):20-27.
29. **Rueda de Clavijo, O.E.** 1987. Estudio de la respuesta inmune celular utilizando como modelo al virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina (RIB). Tesis M.S. Programa de Estudios para Graduados en Ciencias Agrarias. ICA-Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
30. **Segal, S.; Tzehoval, E.; Fridken, M.; Feldman, M.** 1980. What signals macrophage to signal lymphocyte. Rehovot, Israel. The Weizman Institute of Science. (Research Communication No. 65). 87-93.
31. **Singer, A.; Clark, P.J.; Hung, J.P.; Hara, I.** 1981. The regulatory role of macrophages in antigen stimulation. *Adv. Immunol. (USA)*, 31:1-9.
32. **Sorensen, O.S.; Haar, S.; Moller-Larsen, A.; Wildenhoff, K.** 1980. Cell-mediated and humoral immunity to herpesvirus during and after herpes zooster infections. *Infect. Immun.* 29:365-369.
33. **Soulebot, J.P.; Guillermin, F.; Brun, A.; Espinasse, D.J.; Terre, J.** 1982. Infectious bovine rhinotracheitis. Study on the experimentally induced disease and its prevention using an activated, adjuvant vaccines. *Developments Biological Standardization (USA)*, 52:463-483.
34. **Steel, R.G.C.; Torrie, J.H.** 1960. Principles and procedures of statistics. New York. McGraw-Hill. p. 99-180.
35. **Sweat, R.L.** 1983. Persistence of antibodies and anamnestic response in calves vaccinated with inactivated infectious bovine rhinotracheitis virus and parainfluenza 3 virus vaccines. *J. Am. Vet. Med. Ass. (USA)*, 15:809-811.
36. **Villate, J.E.; de León, L.; Ocampo, S.; Cortés, E.; Sierra, P.** 1973. Aislamiento del virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina y reproducción experimental de la enfermedad. Informe ICA, Bogotá. 1973.

ZOOTECNIA

ALIMENTACION DE CERDOS CON SUERO DE QUESO FRESCO EN COMBINACION CON SUBPRODUCTOS DE MOLINERIA O GRANO DE MAIZ

Daniel Sáenz P.; Héctor Obando C.; Arthur A. Owen B.*

RESUMEN

En el primer ensayo se midieron los rendimientos zootécnicos de cerdos durante los periodos de crecimiento y acabado (17 a 90 kg) alimentados con siete raciones: dos sin suero de queso fresco (SQF) basadas en maíz + torta de soya (M + TS) y maíz + torta de algodón (M + TA) o dietas controles, y las otras cinco con (SQF) en combinación con maíz-grano molido (MGM), o uno de los cuatro subproductos de molinería siguientes: harina de arroz (HA), mogolla de trigo (MT), salvado de trigo (ST) y salvado de maíz (SM). En el segundo ensayo se midió el efecto de la alimentación con SQF, únicamente durante el periodo de acabado (43 a 92 kg) en combinación con los mismos subproductos de molinería del primer ensayo. Para

* M.V.Z., M.S., Profesor Asociado Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia. A.A. 53917, Bogotá. M.V.Z., M.S., Programa de Fisiología y Genética Animal, ICA. A.A. 151123 Bogotá. I.A. Ph.D. Programa de Nutrición Animal, ICA. A.A. 233. Palmira, Valle, Colombia.