

Descripción de una respuesta inmune atípica y enfermedad subclínica en una población de lechones infectados experimentalmente con rubulavirus porcino

García CLA*, Rodríguez RA, Quintero RV, Vera GS, García RPB. UNAM-Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, IPN-Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. luciangie30@hotmail.com

Introducción. La enfermedad de Ojo Azul (EOA) es una enfermedad viral endémica exclusiva de México que se describe desde 1980 cuya etiología es el rubulavirus porcino (La piedad Michoacán virus-LPMV). La EOA en poblaciones susceptibles de lechones de 2-15 días de edad tiene presentaciones nerviosas y respiratorias con alto porcentaje de mortalidad y desarrollo de opacidad corneal (Ojo azul) en aproximadamente 10% de los lechones afectados. En cerdos mayores de 2 semanas, la enfermedad clínica puede ser ligera o moderada. La infección experimental por vía nasal u ocular en lechones de 3 días de edad reproduce los signos nerviosos clásicos a los 3-8 días post-inoculación (dpi) con aproximadamente 100% de mortalidad y el virus es aislado y/o detectado en tonsilas, mucosa nasal, bronquios, pulmones, cerebro medio, bulbo olfatorio y ganglio nervioso trigémino. A pesar de la relativa frecuencia de la EOA y de la exhaustiva caracterización molecular del rubulavirus porcino aún existen muchas incógnitas acerca de la respuesta inmune y de la persistencia del rubulavirus porcino en las granjas porcinas. Se menciona que los anticuerpos generados durante la infección por rubulavirus porcino proporcionan protección permanente sin embargo la serología de los animales de las granjas afectadas es inconsistente y la reaparición de brotes es frecuente. La respuesta celular inmune típica consiste en una elevación significativa de los linfocitos T citotóxicos (CD8⁺).

Metodología. La población experimental consistió de 32 lechones no vacunados provenientes de una granja libre de la EOA divididos en 8 lechones en el grupo control y 24 lechones en el grupo experimental inoculado con una cepa de LPMV de bajo pasaje a los 5 días de edad por vía nasal y ocular. Posteriormente, un cerdo del grupo control y 3 lechones del grupo inoculado se sacrificaron diariamente hasta los 8 dpi para la realización de la necropsia y recolección inmediata de tejidos (tonsilas, mucosa nasal, tráquea bronquios, pulmones, cerebro, bulbo olfatorio, médula espinal y linfonodos submandibulares, mediastínicos y mesentéricos) para el aislamiento viral e histopatología de rutina. Adicionalmente, se tomaron muestras de sangre periférica los 0, 3, 5 y 8 días post-inoculación (dpi) para la determinación de las subpoblaciones de linfocitos T utilizando inmunofluorescencia indirecta y citometría de flujo (FACSCALIBUR Becton Dickinson). Brevemente, en un tubo se colocaron 30 μ l de sangre con heparina y 5 μ l del monoclonal correspondiente (CD2, CD4 y CD8) a la dilución apropiada y se incubó durante 30 min. Posteriormente, se añadieron 200 μ l de solución de lisis (Becton Dickinson) y se incubó en oscuridad durante 10 min seguido de dos lavados a 1200 rpm durante 5 min. A continuación se incubó en oscuridad por 30 min con un anticuerpo antiratón marcado con FITC (Bohringer Manneheim) seguido de dos lavados con PBS a 1200 rpm/ 5 min. Para fijar la muestra se adicionó paraformaldehído al 1% y se refrigeró hasta que se realizó la adquisición en el citómetro de flujo. Para la adquisición se utilizó un citómetro de flujo marca FACSCALIBUR (Becton Dickinson). En una gráfica de puntos tamaño versus granularidad, se localizó la región de los linfocitos y se adquirieron 10^3 eventos totales y se determinaron los porcentajes de células positivas a cada marcador mediante el software CELL QUEST. De los valores obtenidos se calcularon el promedio y desviación estándar por grupo.

Resultados. Los animales inoculados no manifestaron cuadro clínico de la enfermedad en el periodo referido. No obstante, se observaron lesiones nerviosas microscópicas compatibles con la EOA caracterizadas por gliosis multifocales e infiltrado linfocitario perivascular. Dichas lesiones inflamatorias fueron mínimas a los 3-4 dpi y leves a los 5-7 dpi con distribución aleatoria en cerebro anterior y medio, tallo encefálico y bulbo olfatorio. A los 8 dpi, las lesiones fueron moderadas y más extensivas y se observaron en todos los cortes analizados. En general, los órganos linfoides evaluados mostraron hiperplasia linfóide. Dada la presencia de lesiones intersticiales preexistentes en los pulmones de los lechones controles no fue posible discriminar las lesiones inducidas por el rubulavirus porcino. Los hallazgos más significativos de las subpoblaciones de linfocitos T en sangre periférica consistieron en una disminución de los linfocitos CD2 y CD8 a los 5 dpi y una elevación de los linfocitos CD4 hacia los 8 dpi.

Discusión. Los resultados de los hallazgos clínicos e histopatológicos revelan que la población inoculada a pesar de que debería de ser susceptible debido a la edad de los lechones y a su procedencia (granja libre durante años de la EOA) presentó una resistencia inusual a la infección por LPMV que se caracterizó por una enfermedad subclínica con lesiones microscópicas leves o moderadas. Dicha aseveración se sustenta en el hecho de que ya se habían realizado inoculaciones experimentales con LPMV utilizando lechones de

dicha granja obteniéndose resultados similares a los reportados en la literatura. Lo interesante de los hallazgos obtenidos es su relación con los resultados de las subpoblaciones de linfocitos T en sangre periférica los cuales muestran que en lugar de observarse la respuesta típica reportada via linfocitos citotóxicos (CD8⁺) estos disminuyeron a los 5 dpi acompañándose de un posterior incremento de los linfocitos T cooperadores (CD4⁺) hacia los 8 dpi. Esta respuesta podría explicarse por una baja virulencia de la cepa empleada que sensibilizó al sistema inmune de manera moderada y pudo resultar en una buena respuesta por medio de los linfocitos cooperadores que fue capaz de modular la respuesta inmune de tal modo que la infección fue controlada eficazmente y no se manifestaron signos de la enfermedad. La información preliminar obtenida de las subpoblaciones linfoides de sangre periférica podría ser enriquecida mediante análisis inmunohistoquímicos posteriores de las subpoblaciones de linfocitos T en los tejidos linfoides recolectados de la población experimental dado que se determinó una marcada hiperplasia linfoide de los mismos. Dicha información contribuirá al estudio de la respuesta celular inmune durante la infección por LPMV.

Implicaciones. Debido a que la respuesta celular inmune es relevante durante las infecciones virales, la completa dilucidación de dicha respuesta en la EOA puede demostrar ser de gran utilidad en la valoración de vacunas y de programas encaminados a la prevención y control del rubulavirus porcino en granjas afectadas.

Referencias. Allan GM et al. 1996. J. Vet. Diagn. Invest. 8: 405-413, McNeilly F et al. 1997. J. Vet. Diagn. Invest. 9: 3-9., Ramírez MH et al. 1997 J. Comp.Pathol. 117: 237-252., Wiman AC et al. 1998. J. Neurovirol. 4: 545-552.