

**CORRELACION ENTRE LA INMUNIDAD CELULAR Y LA SERICA
AL UTILIZAR UN ANTIGENO DE RINOTRAQUETIS
VIRAL BOVINA (IBR)**

ALVARO AGUILAR SETIÉN¹
PABLO CORREA GIRÓN¹
GABRIEL CORNEJO LEGORRETA¹

Resumen

En la literatura todavía existen algunas incógnitas acerca de la correlación entre la inmunidad celular y la sérica. El presente trabajo tiene por objeto conocer si en el caso de IBR existe correlación entre la inmunidad celular determinada mediante la prueba de intradermorreacción (PIDR) y la inmunidad sérica, determinada por la prueba de suero-neutralización (SN). Para explorar así las bases de estandarización de lotes producidos de antígeno inactivado de IBR (Ag IBR) se hicieron diluciones logarítmicas del Ag IBR (40X y de 10^{-1} a 10^{-9}) y se aplicaron por vía intradérmica cantidades de 0.03 ml en la tabla del cuello de 13 bovinos adultos. Antes de la inoculación del Ag IBR, se obtuvo de cada bovino una muestra de suero sanguíneo para determinar el título de anticuerpos séricos mediante pruebas de suero-neutralización, por la técnica de microtitulación. Los animales con bajos títulos de anticuerpos suero-neutralizantes (de $10^{0.77}$ a $10^{1.25}$) ante la PIDR presentaron títulos bajos (de 10^3 a 10^4). Los bovinos con altos títulos de anticuerpos SN ($10^{4.60}$ a $10^{4.65}$), ante la PIDR presentaron títulos altos (de 10^4 a 10^5). El coeficiente de correlación de rangos de Spearman, entre las pruebas de SN y PIDR, fue de 0.87 ($P < 0.01$). Las inflamaciones fueron más severas en animales con altos títulos de anticuerpos y también hubo mayor reacción ante las más altas concentraciones de Ag IBR. Con base en los resultados obtenidos en las condiciones de esta prueba, se concluye que hubo una correlación directamente proporcional entre las pruebas de SN y PIDR al utilizar el Ag IBR. Para estandarizar la potencia del Ag IBR se podrían utilizar grupos de bovinos con diferentes títulos de anticuerpos en los cuales el Ag IBR aplicado por vía intradérmica dará títulos que podrán ser comparados con los que se encontraron con este trabajo.

Estudios recientes demuestran que mediante una prueba de intradermorreacción (PIDR) se puede saber si un bovino ha sido previamente expuesto a la infección por IBR; para llevar a cabo esta prueba se han utilizado antígenos inactivados preparados con virus de IBR (Darcel y Dorward, 1972; Correa, Carmichael y Schultz, 1975; Correa, De Quevedo y Aguilar, 1976). Por medio de histopatología (Aguilar, Uruchurtu y Correa, 1976) y mediante estudios realizados en el INIP con la prueba del factor de inhibición de la migración de los ma-

crófagos (MIF) utilizando glóbulos blancos de animales sensibilizados (Aguilar, comunicación personal), se ha comprobado que esta intradermorreacción es una respuesta de hipersensibilidad celular. Esta PIDR resulta útil para saber si existe IBR en un hato y para estudios epizootiológicos extensos, pues su aplicación es sencilla y no se necesita equipo especial. Por otra parte, la suero-neutralización (SN) es la prueba que generalmente se utiliza para la detección de anticuerpos suero-neutralizantes contra IBR en ganado bovino, considerándose también la más sensible y segura; sin embargo, para llevar a cabo las pruebas de SN se requiere de equipo y personal especializados.

Se ha demostrado que la PIDR tiene un

Recibido para su publicación el 4 de agosto de 1977.

¹ Departamento de Virología, Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, SARH, Km. 15.5 Carretera México-Toluca, Palo Alto, D.F.

alto grado de especificidad, al ser comparada con la SN (Correa, Carmichael y Schultz, 1975; Correa, De Quevedo y Aguilar, 1976). Por lo tanto, este antígeno intradérmico podría ser utilizado en forma extensiva para determinar si la IBR está o no presente en los hatos de diferentes estados. Para ello, se requerirá producir constantemente lotes de antígeno IBR inactivado, el cual deberá tener características estandarizadas en cuanto a potencia y especificidad. Una de las formas en que se podría estandarizar la potencia del Ag IBR sería evaluando el grado de la reacción que induzca en grupos de animales con diferentes títulos de anticuerpos SN, de modo que se pudieran establecer parámetros que sirvieran de base en la producción de futuros lotes de antígeno. Sin embargo, no hay datos respecto a si existe o no correlación constante entre los títulos de anticuerpos SN contra IBR y el título de respuesta intradérmica ante el antígeno IBR. El presente trabajo tiene por objeto conocer si en el caso de IBR existe correlación entre la inmunidad de tipo celular (determinada por la prueba intradérmica) y la inmunidad sérica (determinada por la prueba de suero-neutralización) para explorar así las bases de estandarización del antígeno inactivado de IBR.

Materiales y métodos

Se utilizaron 13 vacas adultas; dos de ellas, de raza Hereford, estaban localizadas en la Unidad Central del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias (Distrito Federal). Las once restantes eran de raza Holstein y estaban localizadas en el Centro Experimental Pecuário de Ajuchitlán, Querétaro. A estos animales se les hicieron las pruebas VN y PIDR.

1. Prueba intradérmica

Se utilizó el mismo lote de Ag inactivado de IBR descrito por Correa, Carmichael y Schultz (1975). De este Ag IBR originalmente concentrado 40X, se hicieron dilucio-

nes logarítmicas, utilizando solución salina bufferada fosfatada (SBF) como diluyente. Cada una de estas concentraciones se inoculó por vía intradérmica (0.03 ml) en diferentes lugares de la región de la tabla del cuello de los bovinos utilizados. Para ello, en la región mencionada de cada uno de los animales, se rasuró una superficie que permitió dibujar sobre la piel un cuadrulado de 10 cuadros alineados (de 9×6 cm) aproximadamente. En el centro del cuadro más próximo a la cabeza se inoculó el antígeno concentrado 40X, en el siguiente cuadro el antígeno diluido 10^{-1} y así sucesivamente, en el centro de cada uno de los cuadros siguientes se inoculó cada una de las diluciones restantes (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8}) hasta concluir con la dilución 10^{-9} que se inoculó en el último cuadro. Antes de la aplicación de las diferentes concentraciones del Ag IBR se midió, con un calibre, el espesor normal de la piel en cada una de las áreas destinadas para ser inoculadas. Posteriormente, transcurridas 48 horas después de las inoculaciones, se midió nuevamente el grosor de la piel en todas las áreas inoculadas. El título que cada animal presentó en respuesta a la inoculación intradérmica del Ag IBR, fue determinado con base en la dilución final de Ag IBR en la cual se observó inflamación a las 48 horas después de su inoculación (Fig. 1).

2. Pruebas de suero-neutralización

Virus.—Para las pruebas de SN se utilizó la cepa Colorado IBR, obtenida del Veterinary Virus Research Institute, Universidad de Cornell, Ithaca, New York, EUA.

Sueros.—Los sueros se obtuvieron asépticamente sangrando a cada uno de los animales antes de llevar a cabo la prueba intradérmica. Se inactivaron a 56°C durante 30 minutos y se congelaron a -15°C hasta el momento de hacer las pruebas correspondientes.

El título de anticuerpos neutralizantes contra IBR, de cada uno de los sueros probados en este trabajo, se determinó utilizando la técnica de microtitulación en placa (Jenny y Wessman, 1973).



FIGURA 1. Respuesta inflamatoria, observada en la región de la tabla del cuello, 48 horas después de la inoculación de diluciones logarítmicas de Ag IBR.

Para establecer la correlación entre las 2 pruebas estudiadas se utilizó el coeficiente de correlación de rangos de Spearman, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$c = 1 - \frac{6 \sum \delta^2}{h(n^2 - 1)}$$

(Snedecor y Cochran, 1967).

Resultados

En el cuadro 1 se encuentran los resultados de las pruebas efectuadas en cada una de las vacas estudiadas. En la primera columna se encuentra la identificación de cada animal, los cuales fueron ordenados en forma descendente, de acuerdo al título de anticuerpos suero-neutralizantes detectado, el cual se puede ver en la segunda columna. En la última columna se puede observar el título ante la prueba intradérmica correspondiente a cada uno de estos animales.

El título máximo del Ag IBR aplicado por vía intradérmica al que respondió uno de los animales de este grupo fue de 10^5 (Cuadro 1). Los animales con bajos títulos de anticuerpos suero-neutralizantes siem-

CUADRO 1

Títulos obtenidos en las pruebas de Suero-Neutralización (SN) y de Intradermorreacción (PIDR)

Vaca Núm.	Título VN	Título PIDR
M-73	100.78 *	10 ¹ *
M-136	100.78	10 ²
M-125	100.78	10 ²
H-A-213	10 ¹	10 ¹
M-64	101.25	10 ²
M-25	101.5	10 ³
M-5	101.5	10 ⁵
M-193	101.73	10 ⁴
M-95	101.73	10 ⁴
M-96	101.97	10 ⁴
M-37	101.97	10 ⁴
H-A-212	101.97	10 ⁴
M-39	102.45	10 ⁴

* Logaritmo de la dilución correspondiente.

pre reaccionaron al antígeno concentrado (40X) y a la dilución 10^{-1} . Los animales con bajos títulos de anticuerpos suero-neutralizantes (de $10^{0.77}$ a $10^{1.25}$), ante la PIDR presentaron títulos bajos (de 10^1 a 10^2). Los bovinos con altos títulos de anticuerpos SN ($10^{1.5}$ a $10^{2.45}$), ante la PIDR, presentaron títulos altos (de 10^4 a 10^5) (Cuadro 1). El coeficiente de correlación de rangos de Spearman encontrado fue 0.87 ($P < 0.01$).

Las inflamaciones fueron más severas en animales con altos títulos de anticuerpos y también hubo mayor reacción ante las concentraciones más elevadas de Ag IBR (Figura 1).

Discusión

En los trabajos realizados por Bascoul *et al.* (1976) se determinó que al utilizar como antígeno un extracto fenolado de *Brucella melitensis*, en humanos, no hubo relación entre la inmunidad celular (determinada por la prueba de transformación de linfocitos) y la inmunidad sérica (determinada por las pruebas de aglutinación y de inmunofluorescencia indirecta).

Algunos autores han observado que con frecuencia un título elevado de anticuerpos circulantes bloquea la inmunidad celular del huésped conduciéndolo a la anergia (anticuerpos bloqueadores). Este podría ser el caso del trabajo realizado por Amil (1977) en el cual se informa que al utilizar antígenos obtenidos de *Histoplasma capsulatum* en humanos, al elevarse los títulos de anticuerpos séricos (determinados por la prueba de precipitación capilar), la hipersensibilidad celular (determinada por la prueba intradérmica y por el MIF) se abate, y viceversa. O sea que dentro de las condiciones en que se han hecho los experimentos de Bascoul (1976) y el de Amil (1977) se han obtenido resultados contradictorios, al comparar un trabajo con el otro. Por otra parte, en el caso de los virus herpes, aparentemente no hay publicaciones en las que se compare la correlación entre la inmunidad sérica y la celular.

En el presente trabajo al utilizar antígeno de IBR, se encontró una correlación estadísticamente significativa entre las pruebas de suero-neutralización e intradermorreacción ($r = 0.87$; $P < 0.01$) utilizando la fórmula del coeficiente de correlación de rangos de Spearman (Snedecor y Cochran, 1967). Se utilizó el coeficiente de correlación de rangos de Spearman debido al tipo de datos, que aunque estaban en una escala continua, eran de diferente naturaleza, ya que unos correspondían a una prueba serológica (SN) y otros medían la inmunidad celular (PIDR). Hay que hacer notar que la prueba utilizada no es paramétrica; si se hubiera dispuesto de una muestra cuyo número de sujetos fuera superior a 35 ($n > 35$) se hubiese podido utilizar un coeficiente de correlación de tipo paramétrico y esto podría haber aumentado el coeficiente de correlación.

En los lugares donde se inoculó el Ag IBR, se observó que las reacciones inflamatorias eran más severas en los animales con títulos más altos de anticuerpos SN. Los animales con bajos títulos de anticuerpos SN siempre reaccionaron ante el antígeno concentrado 40X y a la dilución 10^{-1} . Para estandarizar la potencia de otros lotes de antígeno inactivado IBR, se podrían utili-

zar varios bovinos con diferentes títulos de anticuerpos SN, en los cuales el Ag IBR aplicado por vía intradérmica, daría títulos que junto con los SN podrían ser comparados con los que constan en el presente trabajo.

Con base en los resultados obtenidos en las condiciones de esta prueba, se concluye que hubo correlación entre la inmunidad celular y la sérica al utilizar antígeno de IBR en ganado bovino. Y por lo tanto es válido este procedimiento sugerido para estandarizar lotes de antígeno IBR, con el que se podrán obtener resultados comparables de PIDR con antígeno IBR.

Agradecimiento

Al Dr. Antonio Morilla por sus valiosas opiniones, al Lic. Eugenio Aguilar por su auxilio en los métodos estadísticos y al Dr. Roberto Ruiz por proporcionarnos las facilidades indispensables para realizar este trabajo.

Summary

In the literature, data are still incomplete concerning the correlation between cellular and humoral immunity related to IBR. The objective of the work presented here was to determine whether in IBR there is a correlation between the cellular immunity as determined by a skin test (ST) and the serological immunity, as determined by the serum-neutralization test (SN). Later, these data could be useful to explore the basis for standardization of inactivated IBR antigen (IBR Ag). Logarithmic dilutions of IBR Ag (40X and from 10^{-1} to 10^{-9}) in amounts of 0.03 ml were injected intradermally in the neck region of 13 cows. Before the IBR Ag inoculation, a serum sample was obtained from each cow for determining the SN titer using the Microtitration technique. Animals with low SN titers (from $10^{0.77}$ to $10^{1.25}$) had low titers to the ST (from 10^1 to 10^2). Cattle with high SN titers ($10^{1.5}$ to $10^{2.45}$), had high titers to the ST (10^4 to 10^5). The rank correlation coefficient (Spearman) between the SN

and ST was 0.87 ($p < 0.01$). The skin reactions were larger in animals with high SN titers and in each cow there also was a larger skin reaction to the higher concentrations of IBR Ag. On the basis of the results obtained, it is concluded that there was a proportional correlation between SN and

ST when using the inactivated IBR Ag. For the standarization of different lots of IBR Ag, groups of cows with different SN titers could be used, and their titers to the IBR Ag applied by intradermal route could be compared with those reported in this work.

Literatura citada

- ACUILAR, S.A., A. URUCHURTU y P. CORREA, 1976, Estudio Histológico de la Piel de Bovinos inoculados intradérmicamente con antígeno preparado con virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR), En: *Resúmenes de la XIII Reunión Anual del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias*, SAG, México, D.F., p. 14.
- AMIL E., y MARÍA EMELINA, 1977, Aspectos inmunológicos de la histoplasmosis pulmonar primaria, Tesis para obtener el título de Químico Bacteriólogo Parasitólogo, *Escuela Nacional de Ciencias Biológicas*, Instituto Politécnico Nacional, México, D.F., p. 56.
- BASCOUL, S., M. PERALDI, A. LÓPEZ MERINO, CH. LACAVE, A. CANNAT and A. SERRE, 1976, Stimulating activity of *Brucella* fractions in a human lymphocyte transformation test. Correlation with humoral and cellular immunity, *Immunology*, 31:717-722.
- CORREA, G.P., L.E. CARMICHAEL and R.D. SCHULTZ, 1975, Observations on the response of cattle to a skin test using infectious bovine rhinotracheitis (IBR) inactivated antigen, *Proceedings of eighteenth Annual Meeting of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians*, Portland, Oregon, November 2, 3 and 4, pp. 49-60.
- CORREA, G.P., M. DE QUEVEDO y A. ACUILAR SECTIÉN, 1976, Evaluación en México de la prueba de intradermorreacción para detectar hatos de bovinos previamente infectados con virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina, En: *Resúmenes de la XIII Reunión Anual del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias*, SAG, México, D.F., p. 13.
- DARCEL, C. LE Q. and W.J. DORWARD, 1972, Skin reactivity and infectious bovine rhinotracheitis, *Can. Vet. Jour.*, 13:100-101.
- JENNY, E.W. and S.J. WESSMAN, 1973, Microtiter serology methods for bovine virology. IBR, Nt (Microtiter). In: Serologic microtiter techniques for diagnostic virology. Diagnostic Virology Section, Veterinary Services Diagnostic Laboratory, *Animal, Plant and Health Inspection Service*, Ames, Iowa, February 12, pp. 6-7.
- SNEDECOR, G.W. and W.G. COCHRAN, 1967, Statistical Methods, 7.11, Non parametric methods. Rank correlation, Sixth Edition, *The Iowa State University Press*, Ames, Iowa, USA, pp. 193-195.