

**ESTUDIO HISTOLOGICO DE LA PIEL DE BOVINOS INOCULADOS
INTRADERMICAMENTE CON ANTIGENO PREPARADO
CON VIRUS DE LA RINOTRAQUEITIS
INFECCIOSA BOVINA (IBR) ¹**

ALVARO AGUILAR SETIÉN ²
PABLO CORREA GIRÓN ³
ARMANDO URUCHURTU ⁴

Resumen

Se utilizaron dos vacas Hereford adultas, en las que previamente se comprobó (2 veces) que eran rectoras positivas a la prueba intradérmica con antígeno IBR. En varios lugares de la región costal se les inoculó con 0.03 ml de antígeno IBR (40X) por vía intradérmica. Se utilizó como inóculo control el sobrenadante de una suspensión de células de testículo de bovino (desarrolladas en medio Eagle, con 2% de suero de bovino), previamente lisadas por congelación y descongelación. Después de la inoculación, se tomaron biopsias de los lugares inoculados a los 15 minutos; 1, 6 y 24 horas; y a los 2, 3, 4 y 5 días. Las biopsias se fijaron en formalina al 10% y se hicieron estudios histológicos con las tinciones de hematoxilina eosina y azul de toluidina. En algunas áreas inoculadas con el líquido control, entre los 15 y 30 minutos después de la inoculación, se observó una muy ligera inflamación inicial, caracterizada por hiperemia y vasodilatación, probablemente producida por el traumatismo de la inoculación; posteriormente no hubo alteraciones. Con el antígeno IBR, se provocó una reacción inmediata semejante a la ya descrita; posteriormente (de las 6 a las 24 horas), se observó moderada infiltración de polimorfonucleares. Finalmente, entre las 24 horas y el 5º día, se observó una reacción de tipo retardado, cuyas alteraciones eran típicas de una reacción de hipersensibilidad celular, con abundante infiltración de células linfoides, formando islotes perivasculares. Se concluye que la reacción de tipo retardado, provocada al inocular el antígeno IBR, puede ser considerada como medio de diagnóstico para detectar infecciones previas por el virus de IBR.

Cuando se presenta un brote de abortos en ganado bovino o un síndrome respiratorio hay cierta dificultad al realizar un diagnóstico rápido. Esto se debe a que generalmente se tienen que remitir al labora-

torio más cercano especímenes procedentes de animales sospechosos o bien animales enfermos para hacerles la necropsia y estudios correspondientes de Virología, Bacteriología, etc. También se pueden remitir muestras pares de suero sanguíneo, obtenidas al iniciarse la enfermedad y 2 ó 3 semanas después, para determinar si hubo aumento en el título de anticuerpos contra el agente del que se sospecha (De Quevedo, 1975; Correa, 1976).

En caso de aborto o de síndrome respiratorio, cuando se sospecha de IBR, es necesario hacer un diagnóstico preciso antes de recomendar la vacunación, ya que se debe tener presente que muchas vacunas contra IBR no están suficientemente atenuadas y por lo tanto pueden inducir abortos y di-

Recibido para su publicación el 8 de julio de 1978.

¹ Presentado en el I Simposium Internacional de Laboratorios de Diagnóstico Veterinario, Gto., enero 1977.

² Departamento de Virología, Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias (INIP), SARH, Km. 15.5 Carretera a Toluca, Palo Alto, D.F., México.

³ Jefe del Departamento de Virología, INIP, SARH.

⁴ Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, Ciudad Universitaria, México, D.F.

fundir la enfermedad; y aunque ya hay vacunas nasales suficientemente atenuadas, lo ideal sería gastar en la vacunación contra IBR, con la certeza de que esa enfermedad ya está presente en el hato.

Mediante una prueba de intradermorreacción se puede demostrar que un hato ya ha sido expuesto a la infección por IBR (Darcel y Dorward, 1972; Correa, Carmichael y Schultz, 1975; Correa, De Quevedo y Aguilar, 1976). Esta prueba resulta ser de mucho valor por su facilidad de aplicación en condiciones de campo. Por ello se deben continuar los estudios tendientes a completar el conocimiento de las características de este tipo de reacción.

El objetivo de este trabajo es: 1) conocer, por medio de estudios histológicos, el tipo de inflamación de esta reacción y hacer comparaciones con la inflamación cutánea retardada producida por la tuberculina; 2) mediante la evaluación histológica, saber si esta prueba intradérmica es útil para detectar bovinos previamente infectados con IBR.

Materiales y métodos

1. Animales

Para el presente estudio se utilizaron 2 vacas Hereford (Vacas A y B) de 3 años de edad procedentes del Estado de Sonora. Estas vacas mostraron reacción positiva a la prueba intradérmica con antígeno inactivado de IBR, a los 2 y 3 meses antes de iniciar el experimento. Estas vacas tenían títulos de anticuerpos suero-neutralizantes de 1:93 y 1:18, respectivamente, detectados por medio de la técnica de microtitulación.

2. Preparación del antígeno

El virus de IBR (Cepa Colorado)* se reprodujo en células primarias de testículo de bovino. Después de congelar y descongelar las células infectadas, se separaron

* Proporcionada por "The Baker Institute for Animal Health", Cornell University, Ithaca, New York.

los restos celulares por centrifugación a 2,000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante que contenía los viriones fue concentrado 40 veces por ultrafiltración, utilizando un aparato Dyflow (Amicon Company), el cual tenía un filtro XM 100, que retiene los materiales con peso molecular superior a 100,000. Se inactivó mediante calentamiento a 56°C durante 30 minutos y por medio del tratamiento con β -propiolactona, y posteriormente fue almacenado a -70°C (Correa, Carmichael y Schultz, 1975). De este antígeno viral se inyectó por vía intradérmica una cantidad de 0.03 ml con una jeringa de tipo tuberculina, en los lugares destinados para hacer la prueba.

3. Preparación del líquido testigo

Un líquido que sirvió como testigo se obtuvo a partir del sobrenadante de una suspensión de células de testículo de bovino (en medio Eagle), previamente lisadas por congelación y descongelación; centrifugándolo e inactivándolo a 56°C durante 30 minutos.

4. Aplicación del antígeno

En estas vacas, se rasuró una parte de la región escapular y costal, hasta la doceava costilla; esta superficie permitió dibujar sobre la piel un cuadrulado de 12 cuadros alineados; la dimensión de cada uno de los cuadros fue de 9 x 6 cm, aproximadamente. En el centro de cada uno de los cuadros de la hilera del lado derecho de estos animales se inocularon 0.03 ml del líquido testigo por vía intradérmica y en los del lado izquierdo se inoculó en la misma cantidad el antígeno IBR. En el primer cuadro de cada lado no se hizo ninguna inoculación, y esta área fue utilizada como muestra control no inoculada.

5. Obtención de la biopsia

Tomando como centro el punto de inoculación, se hicieron biopsias de la piel, que medían aproximadamente 1.5 por 1.5 centímetros.

Una biopsia fue colectada a los 60 minutos antes de la inoculación y se utilizó como muestra no inoculada. También se colectaron biopsias de las áreas inoculadas y controles a los 15-30, 30-60 minutos; y a las 6, 24, 48, 72, 96 y 120 horas después de la inoculación.

Las biopsias se pusieron en formalina químicamente pura (Q.P.) al 10% para su fijación y posteriormente se incluyeron en parafina y se hicieron cortes de 5 micras de espesor. Estos se tiñeron con hematoxilina eosina y con azul de toluidina. Esta última tinción permite distinguir a las células cebadas.

6. Evaluación macroscópica de la dermorreacción

Antes de colectar las biopsias, con un vernier se determinó el espesor de cada una de las reacciones inflamatorias. También se hizo una apreciación subjetiva cali-

ficando la inflamación con el criterio usado en el trabajo de Correa, Carmichael y Schultz (1975). La reacción fue considerada como sospechosa (\pm) cuando medía aproximadamente de 0.5 a 1 cm de diámetro; de 1 a 2 cm fue positiva con una cruz (+); y de 2 a 3 cm fue positiva con 2 cruces (++). En esta determinación se tomó en cuenta el diámetro aproximado del eritema y del edema.

Resultados

En los cuadros 1 y 2 se representa en milímetros el espesor de la piel, antes y después de las inoculaciones; las últimas mediciones fueron hechas poco antes de que se tomaran las biopsias correspondientes a cada punto de inoculación. Las variaciones del espesor de la piel en esas reacciones están señaladas en las gráficas 1, 2, 3 y 4.

La observación macroscópica de la reac-

CUADRO 1

Espesor de la piel (mm) y evaluación de la reacción macroscópica antes y después de la inoculación del líquido testigo

Antes de la inoculación	Después de la inoculación (horas)					
	1/4-1/2	1	6	24	48	72
VACA "A"						
7	7*(-)					
7	7	9*(\pm)				
8	8	10	8*(-)			
8	8	8.5	8	8*(-)		
9	9	9	9	9	9*(-)	
9	9	9	9	9	9	9*(-)
VACA "B"						
7	9*(\pm)					
8	8	8*(-)				
8	9	8	8*(-)			
8	9	8	8	8*(-)		
8	9	8	8	8	8*(-)	
8	8	9	8	8	8	8*(-)

* Momento en que se colectó cada biopsia; la determinación del espesor de la piel se hizo en el punto de inoculación, poco antes de colectar la biopsia.

(-) y (+) Se refieren a la observación macroscópica e indican la severidad de la reacción, que corresponde respectivamente a: Negativo (-); y sospechoso (\pm) de 0.5 a 1 cm aproximadamente.

CUADRO 2

Espesor de la piel (mm) y evaluación de la reacción macroscópica
antes y después de la inoculación del antígeno IBR

Antes de la inoculación	Después de la inoculación (horas)							
	1/4-1/2	1	6	24	48	72	96	120
VACA "A"								
8*(-)								
8	10*(+)							
8	12	10*(±)						
8	10	9	9*(-)					
9	14	12	11	13.5*(++)				
9	12	11.5	11	13.5	14*(++)			
10	14	12	12	16	17	17.5*(+++)		
11	13	13	12	15	16.5	16	14*(+)	
12	14	13	12	16	16	15	12	12*(-)
VACA "B"								
6*(-)								
7	9.5*(+)							
6.5	8	7*(±)						
6	7	6	6*(-)					
7	10	9	7.5	12*(++)				
7.5	10.5	9	8	10.5	11*(++)			
8	11	9	9	12	11.5	12*(+)		
9	9.5	9	9	11.5	11	11	9*(-)	
8	10	10	9	11	11	11	9	8*(-)

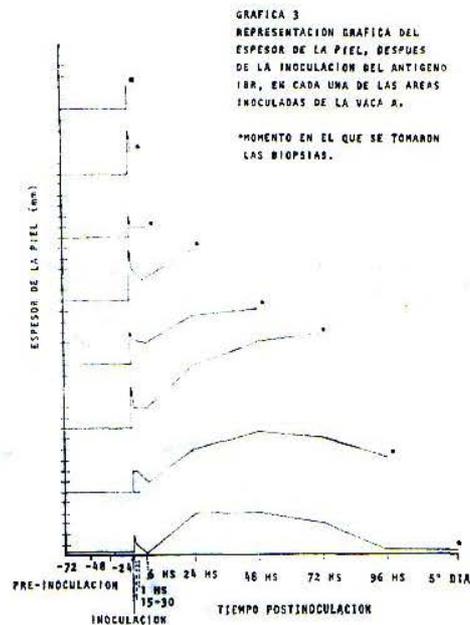
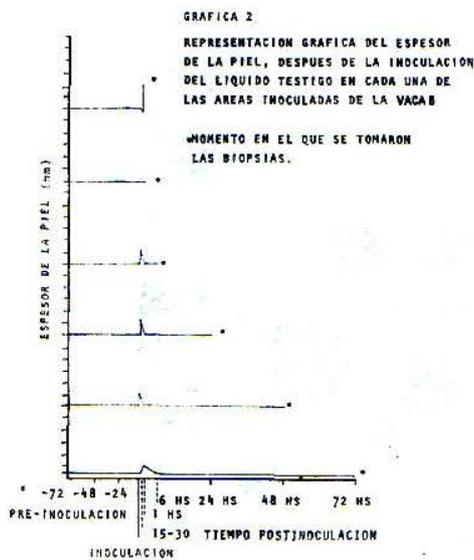
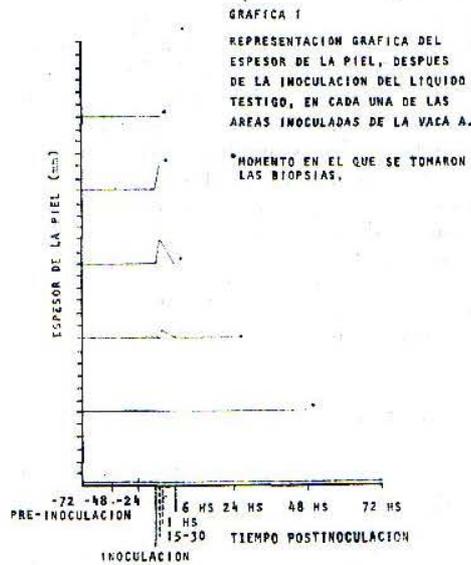
* Momento en que se colectó cada biopsia; la determinación del espesor de la piel se hizo en el punto de inoculación, poco antes de coleccionar la biopsia.

(-), (+), (±), (++) y (+++) Se refieren a la observación macroscópica e indican la severidad de la reacción, que corresponde respectivamente a: negativo (-); sospechoso (±), de 0.5 a 1 cm; positivo (+) de 1 a 2 cm; positivo (++) de 2 a 3 cm; y positivo (+++) de más de 3 cm de diámetro, respectivamente.

ción cutánea provocada por la inoculación del líquido testigo (gráficas 1 y 2) muestra que en algunas áreas inoculadas inicialmente se provocó una ligera inflamación que alcanzó 2 mm de espesor como máximo. Al hacer la lectura correspondiente a las 6 horas después de la inoculación, esta

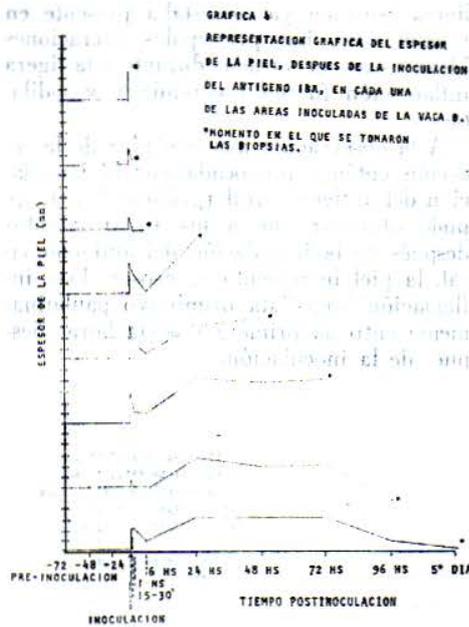
ligera reacción ya no estaba presente en ningún caso. Las principales alteraciones histológicas encontradas durante esta ligera inflamación fueron hiperemia y vasodilatación.

A la observación macroscópica de la reacción cutánea provocada por la inoculación del antígeno viral (gráficas 3 y 4) se pudo observar que a los 15-30 minutos después de la inoculación del antígeno viral, la piel incrementó su grosor. Esta inflamación inmediata disminuyó paulatinamente entre la primera y sexta horas después de la inoculación.



Posteriormente, al hacer la determinación de las 24 horas, se notó un segundo incremento, el cual alcanzó su máximo entre las 24 y las 72 horas (gráficas 3 y 4). Se observó que esta reacción fue más duradera y de mayor espesor que la inmediata. Finalmente, transcurridas 96 horas después de la inoculación, la piel tendió a adquirir su espesor normal.

Al hacer la observación microscópica, se observó principalmente hiperemia y vaso-



dilatación, a los 15-30 minutos después de la inoculación del antígeno viral.

De las 6 a las 24 horas se observó moderada infiltración de células polimorfonucleares en distintos lugares de las prepa-

raciones. También se observó un ligero aumento en el número de células cebadas y algunas de ellas estaban en proceso de degranulación (figuras 1 y 2).

De las 24 a las 72 horas se observó una abundante infiltración leucocitaria en la que dominaban las células mononucleares de tipo linfoide. Esta infiltración formaba islotes que se distribuían en todas las capas de la piel. En donde había mayor acumulación de células de tipo linfoide, se pudieron distinguir algunos eosinófilos (figuras 3, 4 y 5). El área inoculada en el líquido control permaneció sin cambios (figura 6).

A las 96 horas después de la inoculación se observó que los islotes de infiltración leucocitaria, apreciados en la etapa anterior, estaban más aislados, más densos y más pequeños.

Al 5º día después de la inoculación la concentración de leucocitos infiltrados disminuyó notablemente.

Discusión

En algunas áreas inoculadas con el líquido testigo se provocó inicialmente una ligera inflamación cuyas principales alteraciones histológicas fueron hiperemia y va-

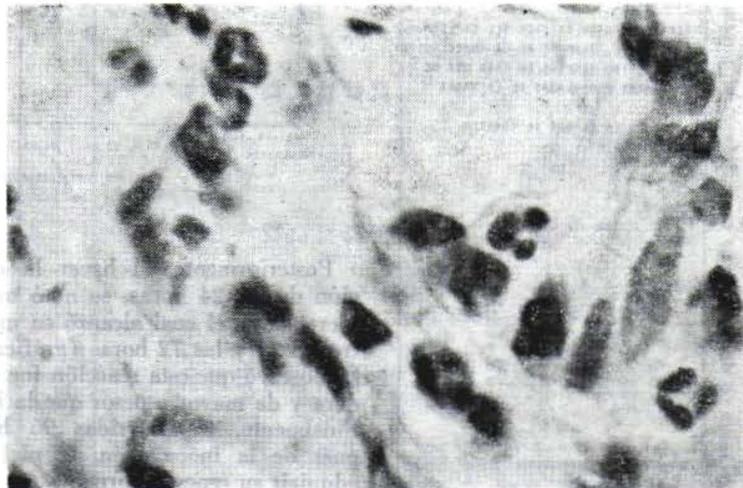


FIGURA 1. Extravasación de células polimorfonucleares, 6 horas después de la inoculación del antígeno IBR (X630).



FIGURA 2. Célula cebada en proceso de degranulación, 24 horas después de haber inoculado el antígeno IBR (X1,000).

sodilatación. Sin embargo, Darcel y Dorward (1972) y Correa, Carmichael y Schultz (1975) informan que al inocular antígenos preparados con cultivos celulares, sin virus de IBR, no se presentaba ninguna reacción inflamatoria. Es probable que la ligera inflamación que se detectó en el pre-

sente trabajo, fuera causada por una leve irritación mecánica, o quizás existía un cierto grado de sensibilidad a las proteínas que componían el líquido testigo. Esto es probable ya que estos animales habían sido inoculados dos veces antes con el mismo líquido testigo.

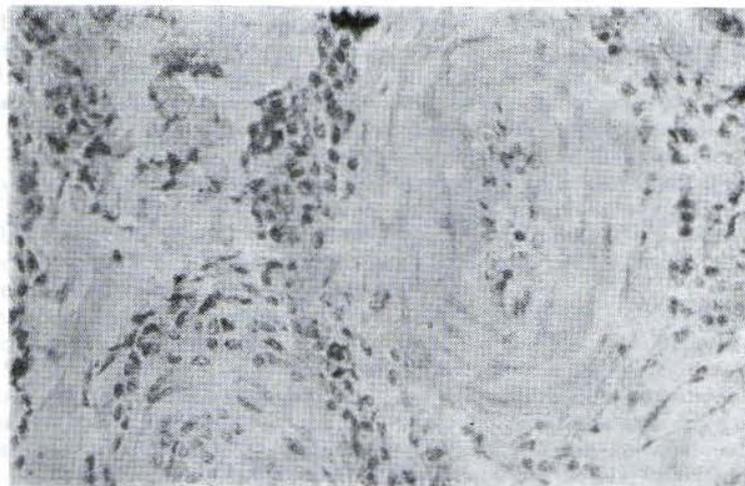


FIGURA 3. Infiltración perivascular de células mononucleares, 72 horas después de haber inoculado el antígeno IBR (X250).

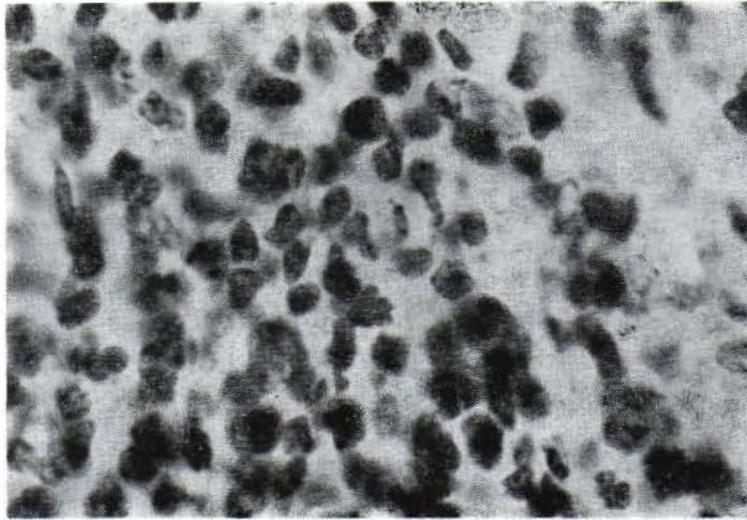


FIGURA 4. Acercamiento de la figura 3, que nos muestra linfocitos y macrófagos infiltrados (X630).

Con la inoculación del antígeno IBR se provocó una reacción que presentaba 2 fases inflamatorias detectadas por el grosor de la piel. La primera fase correspondió a una ligera inflamación que se presentó entre los 15-30 minutos y que a las 6 horas

después de haber inoculado el antígeno IBR ya había disminuido en gran parte. La segunda fase correspondió a una respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado que se presentó entre las 24 y 72 horas después

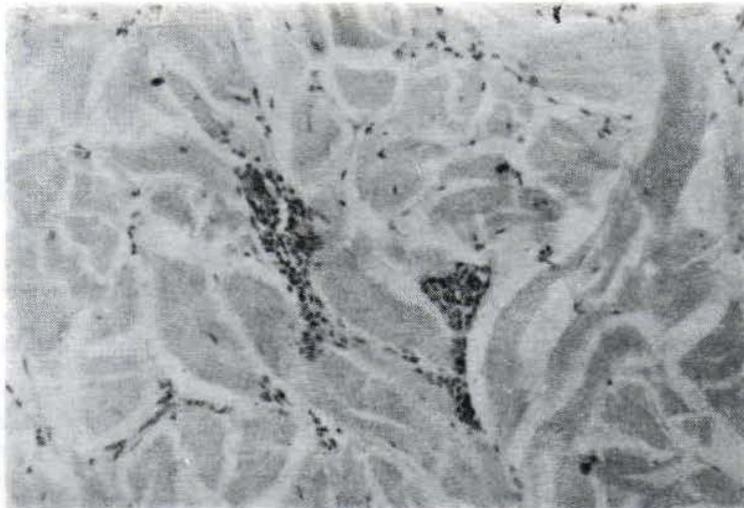


FIGURA 5. Infiltración de células mononucleares formando "islotos" en tejido subcutáneo, 72 horas después de haber inoculado el antígeno IBR (X100).

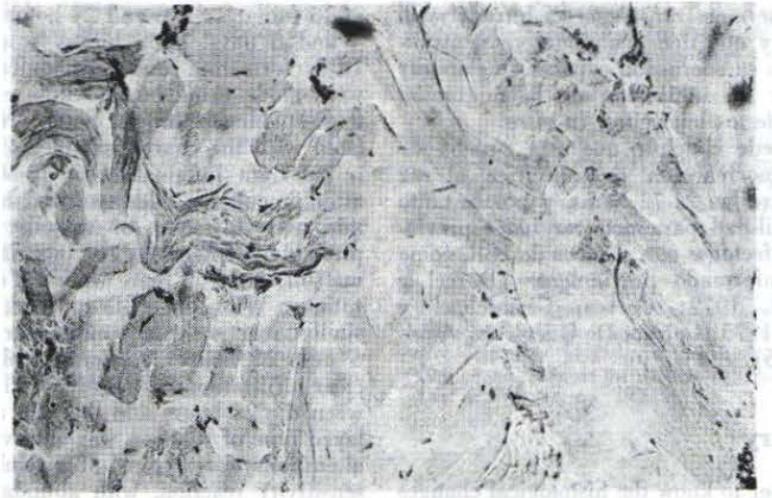


FIGURA 6. Tejido subcutáneo sin ningún tipo de infiltración, 72 horas después de haber inoculado el líquido testigo (X100).

de haber inoculado el antígeno IBR y que desapareció después de las 96 horas.

En relación con los hallazgos microscópicos se detectaron 3 periodos: El primero ocurrió a los 15 minutos, presentándose una semejanza entre la inflamación que resultó de inocular el líquido testigo y la que se presentó al inocular el antígeno IBR. Cabe la posibilidad de que estas reacciones sean una respuesta de hipersensibilidad de tipo inmediato por la presencia de anticuerpos comunes hacia componentes presentes tanto en el antígeno IBR como en el líquido control. Estas sustancias pueden ser restos de células de testículos de bovino o del suero fetal de ternera que se usa como nutriente para los cultivos celulares, o alguna otra proteína. También es posible que la respuesta inflamatoria que resultó al inocular el antígeno IBR sea debida a anticuerpos contra el mismo antígeno que posteriormente produce la respuesta de inmunidad celular (Pérez, Larralde y Kretschmer, 1968; Herbert, 1972).

El segundo período de alteraciones microscópicas empezó 6 horas después de la inoculación del antígeno IBR. Se observó una moderada infiltración de células polimorfonucleares que pudo ser detectada hasta las 24 horas, desapareciendo posterior-

mente. Además se observó un moderado incremento de células cebadas y algunas de ellas estaban en proceso de degranulación. La infiltración de polimorfonucleares y la actividad de células cebadas se debe a una respuesta de hipersensibilidad en la que intervienen complejos inmunes y complemento como es el caso de la reacción de Arthus y la anafilaxia local (Pérez, Larralde y Kretschmer, 1968; Nelson, 1969; Weiser, Myrvik y Pearsall, 1971; Herbert, 1972).

En la tercera fase, de las 24 a las 72 horas después de la inoculación del antígeno IBR, se presentó una respuesta de hipersensibilidad celular. Se observó una marcada infiltración de células linfoides y macrófagos semejante a la que ocurre en la reacción a la tuberculina (Nagler, 1942; Nelson, 1969; Bloom, 1971; Pérez, Uruchurtu y Ordóñez, 1972; Smith y Mengeling, 1976).

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede concluir que la prueba de intradermorreacción fue específica al antígeno de IBR utilizado y corrobora que existe una respuesta de inmunidad celular hacia este virus. Además, apoyando este resultado recientemente, en el Departamento de Virología del INIP se han obtenido evidencias de que los linfocitos obtenidos de ani-

males que muestran respuesta intradérmica positiva y que tienen anticuerpos neutralizantes en su suero, son capaces de elaborar el factor de inhibición de la migración (MIF) de los leucocitos, *in vitro*.

Se puede concluir que esta prueba de intradermorreacción es específica al ser leída entre las 24-72 horas, y por lo tanto es de utilidad para detectar hatos previamente infectados con el virus de IBR, como se ha informado previamente (Darcel y Dorward, 1972; Correa, Carmichael y Schultz, 1975; Correa, De Quevedo y Aguilar, 1976).

Summary

In order to know the histological changes presented in the skin after injection of infectious bovine rhinotracheitis (IBR) virus inactivated antigen, two Hereford cows received 0.03 ml intradermally of IBR (40X) antigen in several areas of the (thoracic) rib region. In two previous occasions these cows were found to be positive reactors to this test. The supernatant of a bovine testicle cell culture (in Eagle medium with 2% bovine serum) previously lysed by freezing and thawing, was used as control. After inoculation a biopsy was taken from each of the inoculated places,

Literatura citada

BLOOM, B.R., 1971, *In vitro* approaches to the mechanism of cell mediated Immune reaction. B. Histology-Nature and Origin of Cells in Delayed-Type Hypersensitivity Reactions, In: *Advances in Immunology*, Vol. 13, Edited by F.J. Dixon, Jr. and H.G. Kunkel, Academic Press, New York and London, pp. 170-172.

CORREA G., P. 1976, Rinotraqueitis infecciosa de los bovinos, En, *Ciencia Veterinaria*, volumen 1. Editor Ricardo Moreno Chan, UNAM, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, México. pp. 131-161.

CORREA, G., P., M. DE QUEVEDO y A. AGUILAR SETIÉN, 1976, Evaluación en México de la prueba de intradermorreacción para detectar hatos de bovinos previamente infectados con virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina, *Resúmenes de la XIII Reunión Anual del Instituto Nacio-*

at 15 minutes; 1, 6 and 24 hours and 2, 3, 4 and 5 days. Each biopsy was fixed in 10% formaline and histological studies were made using hematoxiline eosine and toluidin blue stainings. Some areas inoculated with the control sample, presented a initial light inflammation at 15-30 minutes after inoculation, characterized by hyperemia and dilatation of vassells; this was probably produced by the inoculation traumatism; later on there were not other alterations. With the IBR antigen, a initial similar reaction was found. Later (between 6 and 24 hours) moderate polimorfonuclear infiltration was observed. Finally, between the 24 hours and the 5th. day, a delayed type of reaction was observed, which alterations were typical of a celular hypersensitivity reaction, with abundant linfoid cell infiltration, forming perivascular focus. It is concluded that the delayed type of reaction produced after the inoculation of IBR antigen, can be considered as a diagnostic mean for detecting cows previously infected with IBR virus.

Agradecimiento

A los Drs. L. Carmichael, Antonio Morilla y Apolinar Cruz por sus valiosas opiniones.

nal de Investigaciones Pecuarías, SAG, México, D.F., p. 13.

CORREA, G., P., L.E. CARMICHAEL y 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 Hilton Hotel, Portland, Oregon, November 2, 3 y 4, pp. 49-60.

DARCEL, C. LE Q. and W.J. DORWARD, 1972, Skin reactivity and infectious bovine rhinotracheitis, *Can. Vet. Jour.*, 13:100-101.

DE QUEVEDO, J.M., 1975, Investigación serológica de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina, tesis profesional para obtener el título de M.V.Z., *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia*, UNAM, México, D.F.

- HERBERT, W.J., 1972, *Inmunología Veterinaria*, Capítulo 9, La reacción inmunitaria de base celular. *Editorial Acribia*, Zaragoza (España), pp. 85-86.
- NACLER, F.P., 1942, A specific cutaneous reaction in persons infected with the virus of *herpes simplex*, *J. Immun.*, 48:213-219.
- NELSON, D.S., 1969, Macrophages and immunity 6.2.2. Macrophages and delayed skin reactions, *North Holland Publishing Company*, Amsterdam and London, pp. 144-152.
- PÉREZ D., R., A. URUCHURTU y M.L. ORDÓÑEZ, 1972, Un estudio sobre el proceso inflamatorio de una vaca y la acción de la betametazona, *Veterinaria*, UNAM, volumen 3, Núm. 2, pp. 44-52.
- PÉREZ, T., R.C. LARRALDE y R.R. KRETSCHMER, 1968, *Inmunopatología*, *La Prensa Médica Mexicana*, México, 1, Ill. Inmunidad Celular, pp. 161-164.
- SMITH, P.C. and W.L. MENGELING, 1976, Cutaneous Delayed-Type Hypersensitive reactions in pseudorabies virus-infected swine, *Proceedings International Pig Veterinary Society, Congress*, June 22-24, Ames, Iowa, USA, p. G. 12.
- WEISER, R.S., Q.N. MYRVIK and N.N. PEARSALL, 1971, *Fundamentals of Immunology for Students of Medicine and Related Sciences. B. In vivo Reactions of Delayed Sensitivities. 2. The Cutaneous Tuberculin Reaction*, Philadelphia, *Lea & Febiger*, pp. 192-193.