

AISLAMIENTO DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EN ANIMALES DE LABORATORIO

II. SUSCEPTIBILIDAD COMPARATIVA DE SEIS ESPECIES

O.J. DEGREGORIO¹, V.M. VARELA-DIAZ², M.S. SÖNDAHL², H.S. PAIM²

¹Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires
Avda. Chorroarín 280, Buenos Aires 1427, Argentina

²Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS)
Caixa Postal 589, 20001-970 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Resumen. Los hallazgos del presente estudio demuestran que el hamster es más susceptible a la infección por el virus de la fiebre aftosa que el ratón lactante, habitualmente empleado para efectuar aislamientos de este agente con fines diagnósticos. El hamster mostró una susceptibilidad superior a la inoculación de Aftovirus obtenidos de bovinos infectados naturalmente. La comparación se basó en las manifestaciones clínicas, el tiempo medio de supervivencia, el porcentaje de mortalidad, la relación entre título y mortalidad, y el comportamiento de la infección en animales destetados. Le siguieron en orden descendente de susceptibilidad los meriones, conejos y cobayos lactantes, mientras que las ratas resistieron a la infección. Los resultados se analizan en términos de su implicancia diagnóstica para estudios epidemiológicos y el control de la enfermedad.

Una revisión analítica de la bibliografía sobre el uso de animales de laboratorio para el aislamiento del virus de la fiebre aftosa reveló las limitaciones de la información disponible (7). Sobre esta base se plantea la necesidad de realizar estudios sobre la susceptibilidad comparativa de las distintas especies de animales de laboratorio bajo idénticas condiciones fisiológicas, inoculados con el mismo agente, por la misma vía, con igual dosis, con el mismo volumen y, partiendo de un agente que no haya sufrido adaptación a ningún sistema de laboratorio.

El presente trabajo trata sobre los resultados de un estudio para determinar las ventajas y limitaciones relativas del empleo de ratones, ratas, cobayos, conejos, hamsters y meriones para el

aislamiento del virus de la fiebre aftosa, a partir de muestras epiteliales obtenidas de ganado infectado naturalmente.

MATERIALES Y METODOS

Material proveniente del campo

Se emplearon como inóculo epitelios linguales de bovinos infectados naturalmente con el virus de la fiebre aftosa. Las muestras de epitelio se colocaron en frascos, sumergidas en tampón de glicerina fosfatada. Una de las muestras (Nº 1) provenía de la localidad de Pehuajó, provincia de Buenos Aires, y las otras (Nºs 2 y 3) de la zona de Chapaleufú, provincia de la Pampa, República Argentina. Una dilución al 50% en medio de Vallée de cada virus se distribuyó a razón de 1,4 ml en frascos tipo Vial de 2 ml de volumen, que habían sido esterilizados con luz ultravioleta durante 15 minutos.

Solicitar separatas al:
Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS).

Obtención de antígeno de las muestras epiteliales

Una alícuota (1,4 ml) de cada una de las muestras de epitelio se inoculó en un frasco *roller* de cultivo de células línea BHK₂₁ clon 13 con medio de mantenimiento Eagle y se incubó por 24 horas a 37°C. Ante la detección de un efecto citopático en la monocapa celular, el frasco se congeló a -20°C por 24 horas. Posteriormente, se descongeló en baño María a 37°C, se centrifugó a 4°C durante 10 minutos a 2000 rpm, y se recogió el sobrenadante. Las muestras se conservaron en la heladera a 4°C hasta su utilización como antígeno.

Titulación de virus

El título viral en microplacas con camadas preformadas de células IBRS-2 clon 17 se definió en base a la recíproca de la dilución de dicho virus, expresado en el logaritmo de base 10 (10^{-1} a 10^{-5}), que producía efecto citopático en el 50% de las camadas de células (DI_{50}) (3). El título obtenido en la muestra n° 1 fue $10^3 DI_{50}/ml$, en la muestra n° 2 fue $10^{1.7} DI_{50}/ml$ y en la muestra n° 3 fue $10^{0.85} DI_{50}/ml$.

Especies de animales

Las especies utilizadas fueron: ratones (*Mus musculus*) CF1/Br; ratas (*Rattus norvegicus*) Wistar Crw/Br; conejos (*Oryctolagus cuniculus*) New Zealand; hamsters (*Mesocricetus auratus*) Cpz:Syr; cobayos (*Cavia porcellus*) Hartley Hart, y meriones (*Meriones unguiculatus*) Cpz:Mon.

Cada grupo estaba constituido por diez animales lactantes de cuatro días de vida, la mitad de cada sexo. Se inocularon tres grupos de cada especie a fin de caracterizar la distribución de signos y de mortalidad, así como para estudiar la presentación de mortandad (expresada en horas postinoculación) por especie y sexo. En todo momento, los lactantes se mantuvieron en compañía de su madre.

Los estudios realizados en animales lactantes se repitieron, a fin de obtener mayor información, con animales destetados. A tal efecto, se emplearon ratones (*Mus musculus*) CF1/Br; hamsters (*Mesocricetus auratus*) Cpz:Syr y meriones

(*Meriones unguiculatus*) Cpz:Mon. Cada grupo estaba compuesto por ocho machos de una edad equivalente al tercer día de destetados. Se inocularon tres grupos de cada especie.

Inoculación de animales

Los animales se inocularon con el correspondiente título de virus, en un volumen de 0,03 ml por vía intraperitoneal. En todos los casos se incluyeron como control grupos de animales inoculados solo con diluyente y, otros que no recibieron tratamiento alguno. Los datos sobre la presentación de signos clínicos y mortalidad se registraron durante un periodo de cinco días.

Obtención de antígenos de animales muertos

Los individuos que murieron después de la inoculación experimental se evisceraron, se descartaron la piel, pelos y cabezas, y se procesaron según la técnica descrita para ratones (2). Se utilizó una parte de cada muestra para su tipificación y subtipificación, y otra se conservó a -20°C, para su posterior inoculación en cultivos celulares, a fin de corroborar la producción de efecto citopático por el virus.

Fijación de complemento al 50%

Para la tipificación de todas las muestras, se realizó la prueba de FC_{50} (2). Los antígenos elaborados a partir de animales lactantes y destetados, así como de las muestras de epitelio bovino, se utilizaron en la dilución original de 1:5; aquellos obtenidos de cultivos celulares, en una dilución de 1:1.

Las muestras que mostraron actividad anticomplementaria se diluyeron 1:10 en tampón barbitaral, se clarificaron con 1 ml de cloroformo, y se centrifugaron a 2000 rpm por 20 minutos, antes de repetir la prueba de FC_{50} .

Estudios estadísticos

Para determinar la posible existencia de diferencias significativas en mortandad entre las especies y por sexo se aplicó el Test *t* de Student (23).

Para estimar posibles diferencias significativas en morbilidad y mortalidad entre los grupos inoculados con distintos títulos virales se utilizaron estudios de Independencia, test X^2 (22).

RESULTADOS

Tipificación de muestras epiteliales

La tipificación por FC_{50} de las muestras de epitelios linguales de bovinos confirmó que la muestra N° 1 correspondía antigénicamente al virus O_1 Campos-Brasil/58 y, las muestras 2 y 3 al virus C_3 Argentina/85.

Estudios clínicos y de mortandad en animales lactantes

En el Cuadro 1 se presentan los resultados obtenidos en las especies inoculadas por la vía intraperitoneal con 0,03 ml del virus O_1 (título medio de 10^3 /ml) o de virus C_3 (título medio de $10^{1.7}$ /ml). No se presentaron alteraciones en los animales controles inoculados solo con diluyente, ni en los controles lactantes normales.

Los signos clínicos en animales lactantes inoculados con O_1 Campos fueron: para los cobayos, signos leves, principalmente debilidad y pelo hirsuto y para los ratones, debilidad del tren posterior y disnea *ante mortem*. Solo un hamster presentó signos de disnea y debilidad generalizada antes de

morir, mientras que los meriones mostraron algunos signos neurológicos, especialmente paresia del tren posterior y disnea. Solo un conejo, que sobrevivió hasta las 120 horas postinoculación, presentó paresia, parálisis del tren posterior, y debilidad generalizada antes de morir.

Con respecto al cuadro clínico observado en animales lactantes inoculados con C_3 (título $10^{1.7}$ /ml), los cobayos y los ratones presentaron signos leves, principalmente disnea, debilidad del tren posterior y pelo hirsuto. Aquellos hamsters que sobrevivieron hasta las 120 horas postinoculación presentaron disnea y debilidad del tren posterior, generalizada antes de morir. Finalmente, los meriones solo mostraron signos disneicos.

En el tercer grupo de animales lactantes inoculado por vía intraperitoneal con 0,03 ml del virus C_3 (título medio de $10^{0.85}$ /ml), los conejos, meriones, cobayos y ratas, los controles inoculados solo con diluyente, y los controles normales, no presentaron alteraciones ni mortalidad. Los ratones y los hamsters no presentaron signos clínicos, muriendo en forma súbita un ratón y todos los hamsters.

Estudios clínicos y mortandad en animales destetados

En los animales destetados, inoculados con el virus O_1 (título medio 10^3 /ml), la mortalidad fue del 12,5% en ratones, y del 100% en hamsters. Los meriones inoculados y los grupos controles no presentaron alteraciones.

Los signos clínicos en los hamsters incluyeron disnea, debilidad, parálisis de miembros anteriores y/o posteriores, opistótonos y conjuntivitis bilateral purulenta, seguidos de pérdida de sensibilidad y de conciencia y, finalmente de muerte. Los ratones no presentaron signos clínicos.

Tipificación con antígenos virales de animales infectados

Los resultados de la tipificación en muestras de animales de laboratorio se presentan en el Cuadro 2. En general, el mejor antígeno para la FC_{50} se obtuvo del ratón lactante seguido por los de merión,

CUADRO 1. Mortalidad por Aphthovirus en animales lactantes.

	Virus O_1 Campos			Virus C_3 Indaial		
	Mortalidad (%)	Horas post-inoculación Media	D.S.	Mortalidad (%)	Horas post-inoculación Media	D.S.
Hamsters	100	49,0	18,4	100	84,0	22,7
Ratones	100	65,0	13,2	60	93,6	23,8
Meriones	100	60,0	12,4	60	84,0	12,5
Conejos	100	69,0	22,9	0	-	-
Cobayos	20	40,0	12,4	0	-	-
Ratas	0	-	-	0	-	-

CUADRO 2. Tipificación de muestras de animales lactantes.

	O ₁ (título 10 ³ /ml)			C ₃ (título 10 ^{1.7} /ml)			C ₃ (título 10 ^{0.85} /ml)		
	Posi- tivas	Tipifi- cación directa	Anti- comple- mentarias	Posi- tivas	Tipifi- cación directa	Anti- comple- mentarias	Posi- tivas	Tipifi- cación directa	Anti- comple- mentarias
Ratones	5	4	1	5	4	1	1	-	1
Hamsters	5	3	2	5	3	2	5	2	3
Meriones	5	1	4	5	2	3	-	-	-
Conejos	5	1	4	-	-	-	-	-	-

conejo y hamster lactantes. Los estudios con muestras de animales destetados muertos presentaron resultados similares.

En todos los casos, las muestras presentaron efecto citopático al ser inoculadas en cultivos celulares. Los antígenos de origen animal y de cultivos celulares, se congelaron a -70°C por 90 días, conservando sus características antigénicas.

Estudios estadísticos

El test t de Student reveló que, de las diversas especies inoculadas con virus O₁ Campos (título de 10³/ml), únicamente los hamsters presentaron diferencias altamente significativas en cuanto a la mortandad (P<0,0005) en relación a los ratones (t:3,536) y los conejos (t:3,094), mientras que estas fueron significativas (P<0,025) con respecto a los meriones (t:2,134).

En cuanto al sexo, los hamsters machos presentaron diferencias altamente significativas (P<0,0005) en relación a los ratones machos (t:3,069) y conejos machos (t:3,092), y solo significativas (P<0,0025) en relación a los meriones machos (t:2,340). Solo los hamsters de sexo hembra presentaron diferencias significativas (P<0,0025) con respecto a los ratones de sexo hembra (t:2,194).

Con el virus C₃ (título de 10^{1.7}/ml), no se observaron diferencias significativas entre las especies, ni tampoco entre los machos de las mismas.

Solo en el caso de los ratones hembra se presentaron diferencias significativas (P<0,0025) con respecto a los hamsters hembra (t:1,3979) y a los meriones hembra (t:2,259).

Estudios de morbi-mortalidad ante distintos títulos virales

Los ratones lactantes presentaron un valor de X² = 17,48 cuando se analizaron los resultados de mortalidad, y un valor de X² = 20,32 al estudiar la morbilidad después de la inoculación con los tres títulos del virus de la fiebre aftosa. Por su parte, la morbilidad y la mortalidad en los hamsters lactantes fue constante, con valores de X² = 0 y 2,08 respectivamente.

DISCUSION

El presente estudio aporta evidencia en apoyo de la hipótesis que los hamsters son más susceptibles a la inoculación por Aphthovirus provenientes de bovinos infectados naturalmente que el ratón lactante empleado tradicionalmente. En los hamsters lactantes se evidenció que el período de aparición de muerte era más breve y las manifestaciones clínicas más severas. También se observó que la mortalidad del 100% no estuvo asociada al título de virus inoculado y que ésta se expresaba también en los hamsters destetados. Por otra parte, la susceptibilidad de los meriones, conejos

y cobayos lactantes fue menor y las ratas resultaron refractarias a la infección.

En general, el cuadro clínico, el periodo de aparición de muerte y la mortalidad observados en algunas especies difieren de los registrados en la literatura (7). Esta aparente discrepancia se puede explicar si se considera que los Aphthovirus empleados en este trabajo eran muestras de campo mientras que en las publicaciones revisadas, las cepas habían sido modificadas por pasajes repetidos. De ahí que las manifestaciones más pronunciadas fueron aquellas que estaban asociadas a la inoculación de cobayos con cepas adaptadas a la especie homóloga (8,16); meriones destetados, con virus adaptados por 351 pasajes en cobayo (9); y ratones destetados, con virus modificados por pasajes sucesivos en ratones lactantes (4,13). Al respecto, se reconoce que los pasajes repetidos en cultivos celulares o animales de laboratorio pueden modificar sus características biológicas (7), por lo que su título, infectividad y virulencia pueden incrementarse para el nuevo sustrato, y reducirse para el sistema original.

Por el contrario, estas diferencias en la severidad de infecciones por cepas adaptadas y de campo no se manifestaron en los hamsters lactantes o destetados, ni tampoco en los ratones y meriones lactantes. Esto puede atribuirse a que estos animales poseen una alta susceptibilidad natural al virus de la fiebre aftosa, que se expresa indistintamente con cepas modificadas o de campo, acorde con lo observado en este estudio y en otros (9,11-13,16,20). Tampoco se detectaron estas discrepancias en el caso de los ratones y los conejos lactantes, lo que es compatible con un alto grado de resistencia natural de estos animales a la infección por cepas de campo, registrada en este trabajo así como en otros con Aphthovirus modificados (5,6,16,21).

La técnica de fijación de complemento está ampliamente difundida para el diagnóstico e identificación del virus de la fiebre aftosa. En aquellos casos en los que la muestra es inadecuada o los resultados no son concluyentes, se considera necesario incrementar la cantidad disponible de virus mediante pasajes en cultivos celulares, o en ratones lactantes de 2 a 7 días (17). La mayor

susceptibilidad del hamster demostrada en este estudio sugiere su utilidad en esas situaciones diagnósticas.

Además, el hecho de que el hamster normalmente se vea afectado por un menor número de enfermedades infecciosas que otros roedores de laboratorio (1) y la observación de que se le utiliza regularmente para el aislamiento selectivo de leptospiras a partir de muestras contaminadas (14,15), favorecen su empleo para aislar Aphthovirus de muestras de campo, particularmente cuando se trata de epitelios con un alto grado de contaminación. Otras características, como su fácil crianza y manejo, se prestan para su producción en bioterios de mediana infraestructura, distribuidos ampliamente en los países de América Latina y el Caribe (19).

Asimismo, los hamsters recién destetados, que revelaron una susceptibilidad comparable a la de los lactantes, superan a éstos en lo referente a factores relacionados con el manejo, crianza y desarrollo. Cabe señalar que estos son aspectos críticos, pues distorsionan los índices de morbimortalidad esperados, introducen desvíos significativos en las pruebas, y pueden condicionar los resultados. Otra ventaja de los hamsters recién destetados estriba en que, por su mayor peso, proveen muestras de tejido infectado de mayor tamaño que los hamsters y ratones lactantes.

En general, la inoculación de animales puede efectuarse en laboratorios periféricos de baja complejidad, que son mayoría en este continente (10,18,19). La replicación del virus en animales susceptibles posibilita la ampliación del número de partículas virales y, por ende, favorece su viabilidad durante el traslado de los laboratorios de campo hacia los laboratorios centrales, para estudios especializados. De ahí que sería de interés determinar el valor relativo del hamster y los cultivos celulares para el aislamiento de Aphthovirus. La frecuencia de actividad anti-complementaria en las muestras de hamster sugiere la necesidad de evaluar la efectividad comparativa de otras pruebas actualmente empleadas para la tipificación, en muestras de distintos animales de laboratorio.

RECONOCIMIENTO

El autor principal presentó este trabajo en cumplimiento parcial de los requisitos para el título de *Magister en Salud Animal* de la Universidad de Buenos Aires.

REFERENCIAS

1. CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE. *Guide to the care and use of experimental animal*. Canada, 1984. vol.2. cap. XIV-XV-XXI.
2. CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA. *Manual de diagnóstico de laboratorio de las enfermedades vesiculares*. Rio de Janeiro, PANAFTOSA/OPS/OMS, 1986. 21 p. (Serie de manuales técnicos, 15).
3. CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA. *Virusneutralización en microplacas con camadas preformadas de células IBRS-2 (TNC) para el control de potencia de la vacuna anti-aftosa*. Laboratorio de Referencia. Protocolo. Rio de Janeiro, PANAFTOSA/OPS/OMS, 1992.
4. CUNHA, R.G., EICHHORN, E.A. Influence of cortisone on susceptibility of adult mice to foot-and-mouth disease virus. *Am. J. Vet. Res.* :149-151, 1954.
5. CUNHA, R.G., EICHHORN, E.A. Studies on rabbit-adapted foot-and-mouth disease virus. I. Propagation and pathogenicity. *Am. J. Vet. Res.*: 133-138, 1959.
6. DACORSO FILHO, P., CUNHA, R.G. Lesões observadas em coelhos recém-nascidos inoculados com amostras de tres tipos de vírus de febre aftosa. *Bol. Soc. Bras. Med. Vet.*, 19: 91-102, 1951.
7. DEGREGORIO, O.J.; VARELA-DIAZ, V.M. Aislamiento del virus de la fiebre aftosa en animales de laboratorio I. Limitaciones de la información disponible. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 58: 87-91, 1992.
8. GARCIA MATA, E., FEDERER, K.E., PIZZI, L., ARAMBURU, H.G. Acción patógena del virus aftoso en neonatos de diferentes especies. *Gaceta Veterinaria*, 17 (94): 57-64, 1955.
9. GIROUD, P., CIACCIO, G. Adaptation au mérion du virus aphteux. *C.R. Soc. Biol., Paris.*, 148: 31-32, 1954.
10. INSTITUTO INTERAMERICANO DE COOPERACION AGRICOLA. Red Interamericana de Laboratorios de Salud Animal. *Informe de situación de los laboratorios de salud animal. Programa V*. San José, Costa Rica, IICA, 1988. p.1-36.
11. KORN, G. Die erkrankung des goldhamsters, mesocricetus auratus, au maul-und-klauenseuche. *Arch. Exp. Vet. Med.*, 6 (Suppl.): 36-37, 1952.
12. KORN, G. Die pathogenese und histogenese der maul-und-klauenseuche des goldhamsters, mesocricetus auratus. *Arch. Exp. Vet. Med.*, 7: 192-225, 1953.
13. MAYO, J., LOMBARDO, J.H., SMOLKO, E.E., SEGURA, M., RIVENSON, S. Multiplicación del virus aftoso en roedores adultos previamente irradiados. *Rev. Invest. Agrop. Ser. 4*, 3 (6): 57-69, 1966.
14. MYERS, D.M., VARELA-DIAZ, V.M. Selective isolation of leptospiras from contaminated material by incorporation of neomycin to culture media. *Appl. Microbiol.*, 25 (5):781-786, 1973.
15. MYERS, D.M. *Manual de métodos para el diagnóstico de laboratorio de leptospirosis*. Argentina, CEPANZO OPS/OMS, 1981. (Nota Técnica, 30).
16. NAGEL, H.G. El comportamiento del virus aftoso en animales lactantes diferentes especies. *Gaceta Veterinaria*, 14 (76): 52-59, 1952.
17. OFICINA INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS. *Foot-and-mouth disease: manual de referencia*. Paris, OIE. 1990. vol II, p.1/12-12/12.
18. ORELLANO, C., FRANK, J., HOWARTH, J.A., PALACIOS, C., SEATON, V.A., ACHA, P., MURNANE, T.G. *Informe de la Comisión de Evaluación de los Laboratorios de Diagnóstico Veterinario en las Américas*. San José, Costa Rica, IICA, 1982. 88p. (IICA. Serie salud animal, Pub. Cien, 2).
19. ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. *Diagnóstico de la salud animal en las Américas*. Washington. DC, OPS/OMS, 1983. p. 126-130. (Pub. Cien, 452).
20. SCHMIDT FUNES, E. Receptivité du hamster au virus de la fievre aphteuse. *Bull. Off. int. Epiz.*, 43: 756-760, 1955.
21. SKINNER, H.H., HENDERSON, W.M., BROOKSBY, J.B. Use of unweaned white mice in foot-and-mouth disease research. *Nature*, 169 (4306): 794-796. 1952.
22. SNEDECOR, G.W., COCHRAN, W.G. 1980. *Métodos estadísticos*. 7ª ed. México, Comp. Edit. Continental S.A., 1980. p. 17-53.
23. STEEL, R.G.D., TORRIE, J.H. *Bioestadística: principios y procedimientos*. 2ª ed. New York, Mac.Graw-Hill, 1986. p. 83-116.