

OBSERVACIONES PRELIMINARES SOBRE LA REPLICACION DEL VIRUS EN LA FARINGE Y VIREMIA DESPUES DE INOCULACION INTRADERMOLINGUAL EN BOVINOS CON VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA

*P. Augé de Mello**; *P. Suttmöller**

RESUMEN

Se estudió la replicación del virus de la fiebre aftosa inoculado por vía lingual en bovinos vacunados y no vacunados. Los animales no vacunados presentaban viremia hasta 6 y 12 horas después de la inoculación. También en ese período aparece la replicación del virus en la faringe. Los resultados indican que la replicación del virus en la faringe probablemente es consecuencia de la infección del tracto respiratorio superior. La aparición precoz de viremia en los animales no vacunados es indicativa de una infección de otros sitios en el momento de la inoculación en la lengua.

INTRODUCCION

La titulación de virus de la fiebre aftosa (FA) en el epitelio de la lengua en bovinos (4) ha sido ampliamente utilizada en investigaciones sobre FA. En general se acepta que la replicación del virus ocurre en el sitio de inoculación (lesiones primarias), seguida de viremia y generalización (lesiones secundarias). Sin embargo, cuando se efectúa la inoculación intradermolingual (IDL), es probable que también se infecte el tracto respiratorio superior por aerosol proveniente del retroceso de parte de la suspensión vírica que se está inoculando. La importancia de la infección del tracto respiratorio superior fue señalada por McVicar y Suttmöller (5), quienes mostraron que, entre 6 y 12 horas después de la instilación intranasal de virus de la FA, se obtenían altos títulos en materiales provenientes de la faringe.

Por otra parte, algo de la suspensión vírica podría también ser depositada un poco más profundamente que lo deseado y llegar al sistema

circulatorio. En ese caso el virus podría ser transportado a otros sitios de replicación, independientemente de las lesiones que la inoculación produciría en la lengua.

El presente estudio fue realizado con el propósito de determinar si ocurriría replicación de virus en la faringe y cómo sería la viremia después de la inoculación intradermolingual en bovinos utilizados en una prueba de potencia de una vacuna (2).

MATERIALES Y METODOS

Bovinos

Fueron usados seis bovinos mestizos cebú no vacunados, originarios de una hacienda en la cual no hubo FA durante varios años. Esos animales fueron previamente controlados en lo que se refiere a ausencia de anticuerpos protectores y neutralizantes. Cuatro de esos animales fueron vacunados con vacuna contra la FA inactivada con acetil-etileneimina y que contenía hidróxido de aluminio y saponina como adyuvantes. Esos cuatro animales fueron usados para una prueba de potencia (2) 21 días después de la vacunación. Los 2 animales restantes, no vacunados, sirvieron como controles en la prueba.

Virus

Fue usado el virus de la FA subtipo O₁ cepa Campos en forma de epitelio lingual virulento. Se hicieron diluciones seriadas decimales en Solución Salina de Earle (SSE). El epitelio de la lengua de cada uno de los bovinos vacunados fue inoculado con 0,1 ml en 4 lugares con cada una de las 4

* Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, Caixa Postal 589, ZC-00, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

diluciones que contenían aproximadamente 10 hasta 10.000 DI_{50} /ml. Los bovinos de control fueron inoculados en la misma forma pero con las diluciones de 1 hasta 1.000 DI_{50} /ml.

El virus fue inoculado previa anestesia general usando hidrato de cloral al 40% a razón de 0,2 ml por kilo de peso.

Observaciones clínicas y colecta de muestras

Los animales fueron cuidadosamente examinados a las 44 horas después de la inoculación para determinar las lesiones en la lengua, y a los 3, 5 y 7 días para las de las patas.

Se tomaron muestras de líquido esófago-faríngeo (LEF) con intervalos de 1 hora durante las primeras 6 horas; después cada 2 horas durante las 6 horas siguientes y a las 24, 30, 48 y 72 horas después de la inoculación.

Las muestras del LEF fueron diluidas inmediatamente con cantidades iguales de SSE con 1.000 u.i. de penicilina, 1 mg de estreptomycin y 125 u.i. de fungizona* por ml. Las muestras de sangre heparinizada fueron tomadas a las 6, 12, 24, 30, 48 y 72 horas después de la inoculación. Todas las muestras fueron guardadas a -70°C hasta el momento de usarlas. Antes de la inoculación del virus se retiraron muestras de suero para pruebas de anticuerpos.

Prueba de virus

Los títulos infectantes fueron determinados por la prueba de placas utilizando células IB-RS-2 en monocamada en placas de Petri de 6 cm de diámetro y goma de Karaya como fue descrito por Augé (1). Los títulos infectantes fueron expresados como \log_{10} UFP/ml de la sangre o de LEF no diluidos.

Prueba de anticuerpos

Los sueros obtenidos de las muestras de sangre retiradas antes de la infección fueron sometidos a la prueba de seroprotección de acuerdo con el

método descrito por Cunha y colaboradores (3), y los resultados expresados como índice de seroprotección (ISP).

RESULTADOS

La tabla 1 muestra los resultados de los ISP de las muestras de sueros retiradas antes de la comprobación, así como los resultados de las observaciones clínicas.

Los 2 animales no vacunados presentaron lesiones en la lengua a los 2 días postinfección (DPI) y desarrollaron vesículas en todas las patas. Todos los animales vacunados tenían anticuerpos circulantes y mostraron lesiones en la lengua, en general, solamente en los sitios inoculados con las dosis mayores de virus. No aparecieron lesiones en las patas.

La tabla 2 muestra los títulos de viremia. No se detectó virus en la sangre de los animales vacunados. Los 2 animales no vacunados tuvieron viremia hasta las 6 y 12 horas respectivamente.

Los títulos infectantes del LEF pueden verse en la tabla 3. No se detectó virus en las primeras 4 horas en el bovino 1 ni en las primeras 8 horas en el bovino 2. La replicación de virus en estos 2 animales no vacunados siguió un curso bastante similar al descrito por McVicar y Suttmöller (5) para bovinos inoculados por vía intranasal. El relativamente largo período de retraso indicaría un bajo nivel de infección inicial del área faríngea (5).

En los bovinos vacunados, la replicación del virus fue evidenciada entre las 6 y 10 horas postinoculación. El período de retraso fue mayor, pero los títulos obtenidos fueron comparables a los encontrados por McVicar y Suttmöller (5), usando $10^5 - 10^7$ UFP por vía intranasal, en animales vacunados. En esta experiencia, un total de aproximadamente 5×10^2 DI_{50} bovino fue usado para la inoculación IDL de los controles; y 5×10^3 DI_{50} bovino para los animales vacunados.

La replicación más pobre fue observada en el bovino 3. Con excepción de este animal, el título infectante del LEF alcanzó niveles de

* Squibb

10⁴ UFP/ml, aunque el bovino 6 no evidenció lesiones de lengua. En este experimento preliminar, no hubo relación entre la extensión de las lesiones de lengua o los títulos de anticuerpos y el grado de replicación del virus en la faringe en el grupo de animales vacunados.

DISCUSION

La replicación del virus de la FA en el área faríngea de animales inoculados por vía IDL probablemente es el resultado de la inoculación directa del tracto respiratorio superior ya que la vía sanguínea no es probable en animales vacunados debido a los anticuerpos circulantes.

Los altos títulos obtenidos en material del área faríngea, poco tiempo después de la inoculación IDL, independientemente de los niveles de anticuerpos, indican que ésta vía de inoculación es mucho más compleja de lo que habitualmente se admitía.

También es notable la aparición precoz de virus en la sangre de animales no vacunados, en el momento que recién comienza la replicación en el área faríngea y el epitelio de la lengua se presenta normal. La cantidad de virus liberado, tanto en el área faríngea como en los sitios inoculados de la lengua, probablemente sería insuficiente para dar cuenta del mantenimiento de una viremia de aproximadamente 100 UFP/ml (6). Tales títulos indican que en la inoculación intradermolingual el virus entra en la circulación en el momento de la inoculación y se multiplica luego en otros lugares. Un hecho semejante se observó tras la inoculación de virus de la FA por vía sanguínea y se sugirió que el aumento del título en la sangre poco tiempo después de la inoculación podría ser causado por la replicación del virus en las capas germinativas de la piel o de las membranas mucosas (7).

No se puede excluir la posibilidad de inhalación de virus y la infección profunda del pulmón (7) ya que los animales estaban anestesiados durante la inoculación.

TABLA 1: *Indices de seroprotección en los bovinos antes de la comprobación y resultados de las observaciones clínicas después de la exposición al virus de la fiebre aftosa tipo O₁ por inoculación intradermolingual*

Bovino N°	ISP	Lesiones de lengua					Lesiones de patas
		10 ⁴ *	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	
1	0,4	—	4	4	3	1	4
2	0,5	—	4	4	4	3	4
3	4,2	2	1	0	0	—	0
4	2,3	4	2	3	4	—	0
5	4,2	4	4	2	0	—	0
6	3,8	0	0	0	0	—	0

* Dosis de virus/ml.

NOTA: Bovinos 1 y 2 controles no vacunados.
Bovinos 3, 4, 5 y 6 vacunados.

TABLA 2. *Títulos infectantes en la sangre de los bovinos inoculados por vía intradermolingual con virus de la fiebre aftosa tipo O₁*

Horas post-inoculación	Bovino N°					
	1	2	3	4	5	6
0	—	—	—	—	—	—
6	1,0*	—	—	—	—	—
12	2,6	1,8	—	—	—	—
24	2,6	2,3	—	—	—	—
30	2,8	2,1	—	—	—	—
48	3,1	2,1	—	—	—	—
72	1,4	2,1	—	—	—	—

* Log₁₀ UFP/ml.

NOTA: Bovinos 1 y 2 controles no vacunados.

Bovinos 3, 4, 5 y 6 vacunados.

TABLA 3. *Títulos infectantes en el líquido esófago-faríngeo de bovinos inoculados por vía intradermolingual con virus de la fiebre aftosa tipo O₁*

Horas post-inoculation	Bovino N°					
	1	2	3	4	5	6
0	—	—	—	—	—	—
1	—	—	—	—	—	—
2	—	—	—	—	—	—
3	—	—	—	—	—	—
4	—	—	—	—	—	—
5	1,0*	—	—	—	—	—
6	2,1	—	—	—	0,9	0,9
8	4,4	—	1,1	—	—	—
10	3,3	0,9	1,4	1,4	2,4	—
12	3,8	0,9	1,4	1,0	3,0	1,4
24	5,8	6,0	0,9	2,2	4,9	2,4
30	5,6	5,8	—	2,3	4,4	2,0
48	4,6	6,0	—	4,0	4,9	2,0
72	5,6	5,2	—	3,8	3,0	4,2

* Log₁₀ UFP/ml.

NOTA: Bovinos 1 y 2 controles no vacunados.

Bovinos 3, 4, 5 y 6 vacunados.

REFERENCIAS

1. AUGÉ DE MELLO, P. Prueba de neutralización por reducción de placas para la evaluación de anticuerpos contra la fiebre aftosa. (Plaque reduction neutralization test for the assay of antibodies against foot-and-mouth disease). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 21-22: 25-29, 30-34, 1976.
2. CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA. Manual de procedimientos para el control de las vacunas antiaftosas. *Ser. Man. Téc.* 2, pp 33, 1974.
3. CUNHA, R.G.; BAPTISTA JUNIOR, J.A.; SERRÃO, U.M.; TORTURELLA, I. El uso de los ratones lactantes en la evaluación de los anticuerpos contra el virus de la fiebre aftosa y su significación inmunológica. *Gac. Vet.* (Buenos Aires) 19 (110): 243-267, 1957.
4. HENDERSON, W.M. The quantitative study of foot-and-mouth disease virus. A.R.C. *Report Series No. 8*, Agricultural Research Council, London, 1949.
5. McVICAR, J.W.; SUTMÖLLER, P. Growth of foot-and-mouth disease virus in the upper respiratory tract of non-immunized, vaccinated, and recovered cattle after intranasal inoculation. *J. Hyg. Camb.* 76 (3): 467-481, 1976.
6. SUTMÖLLER, P.; McVICAR, J.W. Pathogenesis of foot-and-mouth disease: clearance of the virus from the circulation of cattle and goats during experimental viremia. *J. Hyg. Camb.* 77 (2): 245-254, 1976.
7. SUTMÖLLER, P.; McVICAR, J.W. Pathogenesis of foot-and-mouth disease: the lung as an additional portal of entry of the virus. *J. Hyg. Camb.* 77 (2): 235-244, 1976.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración de los doctores A. Alonso Fernández e Ivo Gomes y la asistencia técnica de los señores Pedro J. Vieira y Lourival P. da Silva.